

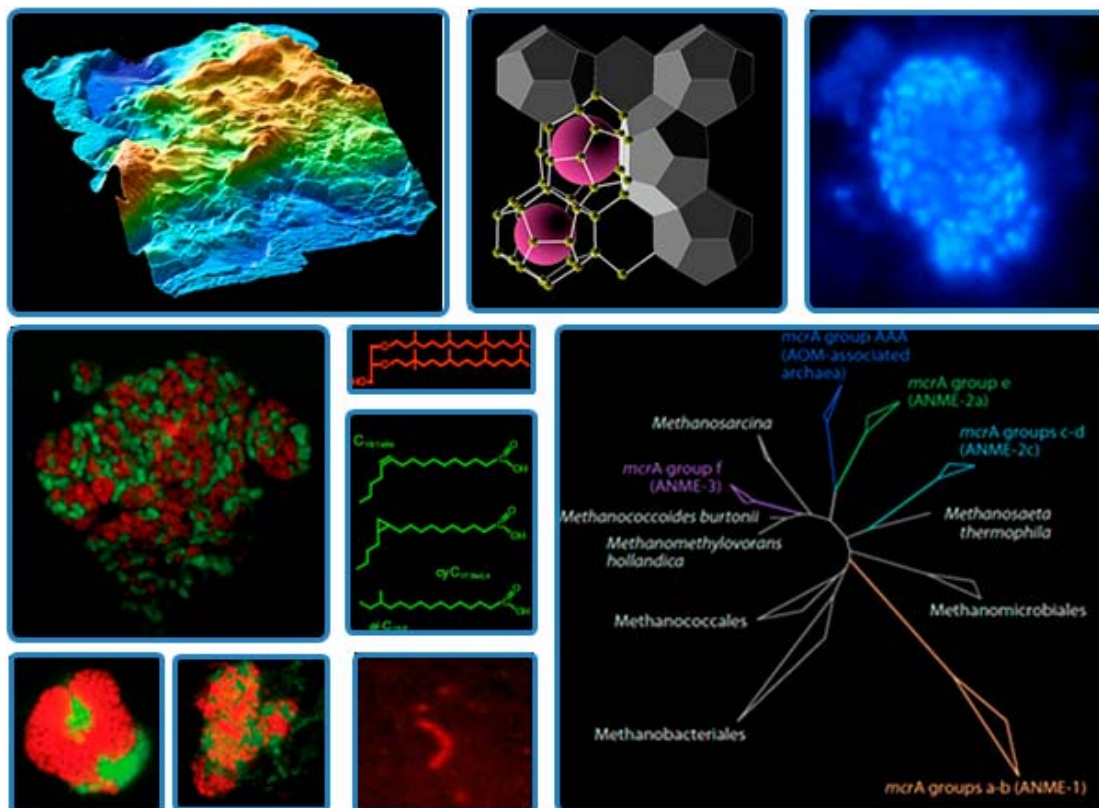


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΑΡΙΑ Γ. ΠΑΧΙΑΔΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΓΕΩΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ
ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΘΑΝΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ
ΙΖΗΜΑΤΑ ΜΕΘΑΝΙΟΪΔΡΙΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

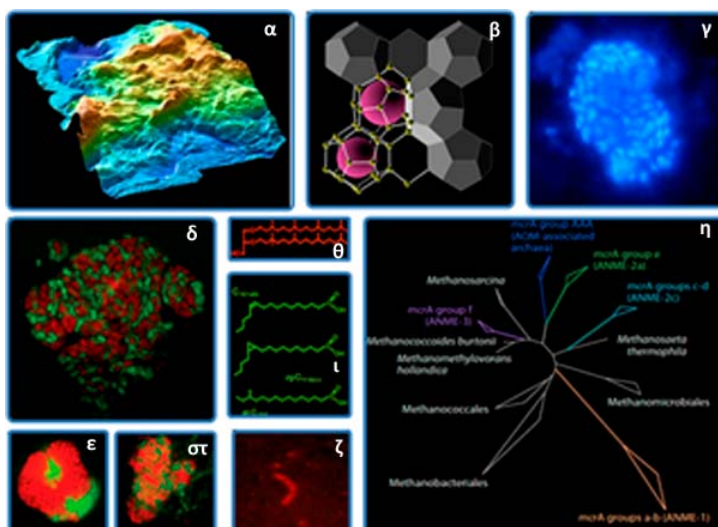


ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2010

© Μαρία Γ. Παχιαδάκη

«Μοριακός και βιογεωχημικός χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αναερόβια οξείδωση μεθανίου και τη μεθανιογένεση σε ιζήματα μεθανιοϋδριτών της Ανατολικής Μεσογείου»

σύνθεση εσωφύλλου



επιμέλεια σύνθεσης: Σπύρος Γκέλης
φωτογραφίες γ. και ζ.: Άρλυ Καλλιονάκη

α. τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής των Ορέων του Αναξίμανδρου (από Lykousis *et al.* 2009), β. σχηματική απεικόνιση μεθανιοϋδριτών (από Bohrmann & Torres, 2006), γ. φωτογραφία (χρώση DAPI) συντροφίας, δ. και στ. φωτογραφίες (οπτικοποίηση μέσω FISH) συντροφιών ANME-2 και DSS κυττάρων (Knittel & Boetius, 2009), ε. φωτογραφία (οπτικοποίηση μέσω FISH) συντροφίας ANME-3/*Desulfobulbus* (Knittel & Boetius, 2009), ζ. φωτογραφία (οπτικοποίηση μέσω FISH) κυττάρων ANME-1, η. φυλογενετικό δέντρο των ANME (Knittel & Boetius, 2009), θ. και ι. χαρακτηριστικοί λιπιδιακοί βιοδείκτες

Συμβουλευτική Επιτροπή

Ευριπίδης Στεφάνου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπων Καθηγητής)
Αλεξάνδρα Γώγου, Ερευνήτρια Γ΄,

Κωνσταντίνος Κορμάς, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εξεταστική Επιτροπή

Βασίλειος Λυκούσης, Διευθυντής Ερευνών, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Δημήτριος Γανωτάκης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευριπίδης Στεφάνου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αναστάσιος Τσελεπίδης, Καθηγητής, Τμήμα Ναυτιλιακών Σπουδών, Πανεπιστήμιο Πειραιά

Γεώργιος Τσιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αλεξάνδρα Γώγου, Ερευνήτρια Γ΄, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Κωνσταντίνος Κορμάς, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Έχουμε τόση θάλασσα μπροστά μας
Εκεί που τελειώνουμε εμείς αρχίζει η θάλασσα

Κική Δημουλά, Το λίγο του κόσμου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	iii
ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	vii
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΚΙΑΓΡΑΦΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 ΜΕΘΑΝΙΟ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΙΟΥΔΡΙΤΕΣ	3
1.1.1 Το μεθάνιο	3
1.1.1.1 Ισοτοπική σύσταση του μεθανίου	3
1.1.1.2 Προέλευση του μεθανίου	3
1.1.1.3 Ισοτοπική σύσταση του άνθρακα των λιπιδίων	4
1.1.1.4 Σημασία του μεθανίου	5
1.1.2 Οι μεθανιοϋδρίτες	5
1.1.2.1 Σύσταση και δομή των μεθανιοϋδριτών	5
1.1.2.2 Σχηματισμός και σταθερότητα των μεθανιοϋδριτών	6
1.1.2.3 Μεθανιοϋδρίτες και ισοζύγιο του μεθανίου	7
1.1.3 Ηφαίστεια ιλύος	8
1.1.3.1 Σημασία των ηφαιστειών ιλύος	9
1.1.3.2 Κατανομή των ηφαιστειών ιλύος	9
1.1.3.3 Ηφαίστεια ιλύος στην Ανατολική Μεσόγειο	10
1.1.3.4 Το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam	11
1.1.3.5 Το ηφαίστειο ιλύος Kazan	12
1.2 ΤΟ ΜΕΘΑΝΙΟ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΙΖΗΜΑΤΑ	14
1.2.1 Μικροβιακή Μεθανιογένεση	14
1.2.2 Αερόβια Οξείδωση του Μεθανίου	15
1.2.3 Θεϊκή Αναγωγή	16
1.2.4 Οξείδωση ανηγμένων ενώσεων του Θείου	17
1.2.5 Αναερόβια Οξείδωση του Μεθανίου	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΛΙΠΙΔΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	23
2.1 ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΑ ΛΙΠΙΔΙΑ	23
2.1.1 Τα λιπίδια στη μελέτη των βιοκοινοτήτων	23
2.1.2 Βιοδείκτες των Archaea	24
2.1.3 Βιοδείκτες των Bacteria	25
2.1.4 Χρωματογραφία αερίων	28
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.2.1 Δειγματοληψία	28
2.2.2 Μέτρηση μεθανίου, θειούχων και θειικών ιόντων	29
2.2.3 Εκχύλιση ολικού οργανικού υλικού	30
2.2.4 Χρωματογραφία αερίων	31
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
2.3.1 Amsterdam MV	31
2.3.1.1 Ανάλυση του κλάσματος των αλκοολών	35
2.3.1.2 Ανάλυση του κλάσματος των λιπαρών οξέων	35
2.3.2 Kazan MV	38
2.3.2.1 Ανάλυση του κλάσματος των αλκοολών	38
2.3.2.2 Ανάλυση του κλάσματος των λιπαρών οξέων	41
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
2.4.1 Βιοδείκτες των Archaea	42
2.4.2 Βιοδείκτες των Bacteria	45
2.4.3 Τα λιπαρά οξέα ως δείκτες περιβαλλοντικής πίεσης των Bacteria	48

2.4.2 Βιοδείκτες ευκαρυωτικών οργανισμών	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	51
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ	51
3.1.1 Το μόριο της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA ως φυλογενετικός δείκτης	51
3.1.2 Φυλογενετική ανάλυση	51
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
3.1.1 Δειγματοληψία	53
3.2.2 Εκχύλιση DNA	53
3.2.3 Ενίσχυση του 16s rRNA γονιδίου, κλωνοποίηση, φυλογενετική ανάλυση	54
3.2.4 Κάλυψη των βιβλιοθηκών κλώνων	55
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
3.3.1 Amsterdam MV	56
3.3.1.1 Archaea	56
3.3.1.2 Bacteria	59
3.3.2 Kazan MV	66
3.3.2.1 Archaea	66
3.3.2.2 Bacteria	67
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ	85
4.1 ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ	85
4.1.1 Μεθοδολογία μελέτη της βιοποικιλότητας	85
4.1.2 Δείκτες βιοποικιλότητας	86
4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	87
4.2.1 Δείκτες Shannon-Wiener και Pielou	87
4.2.2 Ανάλυση ομαδοποίησης	87
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
4.3.1 Δείκτες βιοποικιλότητας	87
4.3.2 Ανάλυση ομαδοποίησης	89
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ	95
5.1 ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΟΣΥΝΕΝΖΥΜΟΥ Μ	95
5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	97
5.2.1 Ενίσχυση του <i>mcrA</i> γονιδίου, έλεγχος παρουσίας	97
5.2.2 Κλωνοποίηση, φυλογενετική ανάλυση	97
5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	98
5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΝΘΕΣΗ	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	111
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	141
ABSTRACT	145

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

*two roads diverged in a yellow wood,
and sorry I could not travel both
and be one traveler, long I stood
and looked down one as far as I could
to where it bent in the undergrowth;
then took the other, as just as fair,
and having perhaps the better claim,
because it was grassy and wanted wear;
though as for that the passing there
had worn them really about the same,
and both that morning equally lay
in leaves no step had trodden black.
oh, I kept the first for another day!
yet knowing how way leads on to way,
I doubted if I should ever come back.
I shall be telling this with a sigh
somewhere ages and ages hence:
two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
and that has made all the difference.*

“the road not taken” by Robert Frost

.....

από τότε που θυμάμαι τον εαυτό μου αμφισβητούσα την ύπαρξη ιδεατού προορισμού τόσο στην επιστήμη, όσο και στη ζωή. Γοητευόμουν – και γοητεύομαι – από το ταξίδι, το άγνωστο, το δυσπρόσιτο, το απρόσμενο.

.....

κάπως έτσι ξεκίνησε αυτή τη διατριβή. Τώρα που ολοκληρώνεται, νιώθω μεγάλη ευγνωμοσύνη που αξιώθηκα το δρόμο αυτό. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, από καρδιάς, όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν αρωγοί σε αυτήν την πορεία:

Τον επιβλέποντα Καθηγητή Ευριπίδη Στεφάνου για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διδακτορική μου διατριβή. Παρόλο που το θέμα ήταν σχετικά μακριά από τον ερευνητικό τομέα που υπηρετεί με επιτυχία τα τελευταία χρόνια, δέχτηκε να επιβλέψει αυτή τη διατριβή, ενώ παράλληλα με περιέβαλλε με απόλυτη εμπιστοσύνη και μου πρόσφερε απεριόριστη ελευθερία κινήσεων.

Την ομάδα σχεδιασμού και συγγραφής της ερευνητικής πρότασης ΠΕΝΕΔ 669, Ερευνήτρια Γ' Αλεξάνδρα Γώγου, Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Κορμά και Ερευνητή Α' Βασίλειο Λυκούση, για τη χρηματοδότηση τη διατριβής μου, καθώς και την πολύτιμη καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια αυτής.

Την Ερευνήτρια Γ' Αλεξάνδρα Γώγου, επίσης, για την εισαγωγή μου στον κόσμο της Οργανικής Γεωχημείας.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Κορμά, ιδιαιτέρως, για τον άπλετο χώρο και το χρόνο, τις συναρπαστικές συζητήσεις, την αμέριστη εμπιστοσύνη και ενθάρρυνση. Κυρίως όμως, για τα σημαντικά μαθήματα ζωής.

Τον Καθηγητή Χρήστο Νεοφύτου, Πρόεδρο του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και όλο το προσωπικό για τη φιλοξενία στις εγκαταστάσεις. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Κατερίνα Βλαχάκη για τη φροντίδα στα «δύσκολα» εργαστηριακά και συγγραφικά βράδια.

Τον Καθηγητή Kai-Uwe Hinrichs, επικεφαλή της ομάδας Οργανικής Γεωχημείας (Organische Geochemie) του Πανεπιστημίου της Βρέμης (Universität Bremen) για την αμεσότητα, το ενδιαφέρον για την δουλειά μου, την προσφορά των γνώσεων και του εργαστηρίου του, αλλά κυρίως για την ηθική του συμπαράσταση. Επίσης, το διευθυντή του εργαστηρίου Dr. Marcus Elvert για τη σημαντική του βοήθεια και τη μετάδοση της εμπειρίας του. Vielen Danke!

Τον Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη, τον Καθηγητή Αναστάσιο Τσελεπίδη, τον Ερευνητή Α' Βασίλειο Λυκούση και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη για τη συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής και τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους. Τη Μαρία Βασιλάκη για τις διευκολύνσεις σε όλα τα «γραφειοκρατικά» ζητήματα.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαρία Μουστάκα, την Επίκουρη Καθηγήτρια Έλενα Μεντέ, το Λέκτορα Αθανάσιο Τσίκληρα, την Dr. Virginia Edgcomb και τον Καθηγητή Dr. Thorsten Stoeck, που μου έδειξαν, με διαφορετικό τρόπο ο καθένας, πόσο απλά αλλά ταυτόχρονα όμορφα και ουσιαστικά μπορούν να γίνονται τα πράγματα στην επιστήμη.

Τη Σάββη Βαρδάκα, το Σπύρο Γκέλη, την Ήρα Καραγιάννη, την Άρλυ Καλλιονάκη, τη Ματίνα Κατσιάπη, το Σάββα Γιαννίτσαρη, τη Δέσποινα Λυμπεροπούλου, την Αλεξάνδρα Μεζίτη, την Ανθούλα Τσουκαλά και το Γιάννη Γούγα για τις όμορφες ώρες, που περάσαμε δίπλα – δίπλα στον εργαστηριακό πάγκο και στο γραφείο. Για τα γέλια, τις φωνές, τις συζητήσεις και τις μουσικές που έκαναν τη δουλειά ακόμα πιο ευχάριστη. Για τις πολύτιμες φιλίες που προέκυψαν από αυτή τη «συγκατοίκηση».

Το Γιώργο Κατσούρα, για την παράλληλη πορεία που κάναμε, τις αγωνίες, τους προβληματισμούς και χαρές που μοιραστήκαμε. Τον Παύλο Ανδριόπουλο, για πάρα πολλά, τα περισσότερα ανείπωτα. Τη Νατάσσα Γιώτη για τη συνεχή διαδικτυακή επικοινωνία και τις λίγες, αλλά απίστευτα διασκεδαστικές βόλτες. Τον Δημήτρη Δαμαλά για το νοιάξιμο. Τους φίλους, που μου έλειψαν πολύ, Ευγενία Ιωαννίδου, Δημήτρη Μουζακίτη, Δημήτρη Παπαδάκη, Γιώργο Μουστάκη, Κώστα Κυπριώτη, Γιάννη Σούλα, Γιώργο Κοτζαμάνη, Φίλιππο Κουκουριτάκη για όλα όσα έκαναν για μένα. Τον Χρήστο Παπαμιχάλη για τα παραμύθια της νυχτιάς και όχι μόνο. Τον Todd, κυρίως για την αισιοδοξία. Όλους τους νέους φίλους που γνώρισα.

Τον Πάνο Λεβέντη, που ήταν εκεί κάθε φορά που χρειάστηκα βοήθεια και μου την πρόσφερε απλόχερα χωρίς καν να τη ζητήσω, καθώς και για όλα τα όμορφα.

Τη Σάββη για την αμέριστη συμπαράσταση αλλά ιδιαιτέρως για εκείνο το βράδυ.

Το Σπύρο. Για όλα.

Τη Γιάννα και τον Άρη, τους καλύτερους γονείς που υπάρχουν, για την αγάπη.

Εκείνο το χειμώνα, τον ομορφότερο της ζωής μου.

Τους μικροοργανισμούς, για τα συναρπαστικά τους μυστικά.

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ANME (<u>A</u> naerobic <u>M</u> ethane <u>O</u> xidizers)	μεθανότροφα Archaea
AOM (<u>A</u> naerobic <u>M</u> ethane <u>O</u> xidation)	αναερόβια οξείδωση του μεθανίου
cmbsf (<u>cm</u> <u>b</u> elow <u>s</u> ea <u>f</u> loor)	cm κάτω από την επιφάνεια του πυθμένα
DAGE (<u>D</u> ialkylglycerolether)	δι-αλκυλγλυκερολαιθέρας
DBB (<u>D</u> esulfobulbus related sulfate reducers)	θεικοαναγωγικά Βακτήρια του κλάδου <i>Desulfobulbus</i>
DNA (<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid)	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DSS (<u>D</u> esulfosarcina- <u>D</u> esulfococcus related sulfate reducers)	θεικοαναγωγικά Bacteria του κλάδου <i>Desulfosarcina-Desulfococcus</i>
dw (<u>d</u> ry <u>w</u> eight)	ξηρό βάρος
MAGE (<u>M</u> onoalkylglycerolether)	μονο-αλκυλγλυκερολαιθέρας
MCR (<u>M</u> ethyl- <u>C</u> oenzyme <u>M</u> Reductase)	αναγωγή του μεθυλοσυνενζύμου M
MMO (<u>M</u> ethane <u>M</u> ono <u>o</u> xxygenase)	μονοοξυγενάση του μεθανίου
MV (<u>M</u> ud <u>V</u> olcano)	υποθαλάσσιο ηφαίστειο
OxM (Aerobic Oxidation of Methane)	αερόβια οξείδωση του μεθανίου
PCR (<u>P</u> olymersa <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNA (<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid)	ριβονουκλεϊκό οξύ
SOB (<u>S</u> ulfide <u>O</u> xidizing <u>B</u> acteria)	θειοοξειδωτικά Βακτήρια
SR (<u>S</u> ulfate <u>R</u> eduction)	θεική αναγωγή
SRB (<u>S</u> ulfate <u>R</u> educing <u>B</u> acteria)	θεικοαναγωγικά Βακτήρια
UCM (<u>U</u> nresolved <u>C</u> omplex <u>M</u> aterial)	Μίγμα μη Διαχωριζόμενων Ουσιών

ΣΚΟΠΟΣ

ΚΑΙ ΣΚΙΑΓΡΑΦΗΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι υποθαλάσσιες πηγές μεθανίου είναι ένας τομέας έρευνας που έχει προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια λόγω του οικολογικού, οικονομικού και εξελικτικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει αυτό το περιβάλλον. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα πλούσια σε μεθάνιο υποθαλάσσια ιζήματα οφείλονται, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους, στους μικροοργανισμούς.

Οι δυσκολίες στην κατανόηση των μηχανισμών και την αναγνώριση των μικροοργανισμών που μετέχουν σε αυτές τις διεργασίες μετά από τρεις περίπου δεκαετίες μελέτης έχει οδηγήσει τους επιστήμονες στη διεπιστημονική μελέτη του θέματος. Η καταγραφή και ο χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε αυτά τα οικοσυστήματα αποτελούν μέρος της βασικής έρευνας για αυτά, αλλά και επιτρέπουν να μελετηθούν οι πιθανές σχέσεις μεταξύ τους και με το περιβάλλον. Ταυτόχρονα, μέσω της συγκριτικής μελέτης αυτών των «εξειδικευμένων» βιοκοινοτήτων και οικοσυστημάτων μπορεί να διερευνηθεί εκ νέου η ισχύς της υπόθεσης (της οικολογίας των μικροοργανισμών) “everything is everywhere, but, environment selects” (Beijerinck 1913, Baas Becking 1934).

Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής, επιχειρήθηκε η ανάλυση ενός υποθαλάσσιου συστήματος πηγών μεθανίου, του πεδίου των Ορέων του Αναξιμανδρου, στην Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα. Η γεωλογική μελέτη της περιοχής έδωσε τις πρώτες ενδείξεις ότι πρόκειται για μία περιοχή πλούσια σε πηγές μεθανίου. Οι πρώτες έρευνες που αφορούν τους μικροοργανισμούς χρησιμοποιούν την

ανάλυση των λιπιδιακών βιοδεικτών και εστιάζονται κυρίως στη διερεύνηση της Αναερόβιας Οξίδωσης¹ του Μεθανίου [Anaerobic Oxidation of Methane, AOM] (Pancost *et al.* 2000, Pancost *et al.* 2001a, Pancost *et al.* 2001b). Ακολούθησε και συνδυασμός της μελέτης των λιπιδιακών βιοδεικτών με τη φυλογενετική διερεύνηση των Archaea (Aloisi *et al.* 2002).

Αυτές οι εργασίες, όπως και άλλες που ακολούθησαν (Heijs *et al.* 2005, Bouloubassi *et al.* 2006, Heijs *et al.* 2006) εστίασαν κυρίως σε επιφανειακά ιζήματα, μικροβιακούς τάπητες και επίπαγους ανθρακικού άλατος και παρείχαν σημαντικές πληροφορίες για τους βιοδείκτες, που εμπλέκονται στη διεργασία της AOM, και τους πιθανούς παραγωγούς τους. Οι πρώτες οικοφυσιολογικές προσεγγίσεις του συστήματος πραγματοποιήθηκαν στο Kazan MV μέσω της κατανομής των λιπιδιακών βιοδεικτών (Werne *et al.* 2002, Werne *et al.* 2004) αλλά εστιάστηκαν κυρίως στην ισοτοπική σύσταση αυτών.

Το κεφάλαιο 1 παρουσιάζει συνοπτικά το ρόλο του μεθανίου γενικά αλλά κυρίως στα θαλάσσια ιζήματα, τις σημαντικότερες πηγές μεθανίου στον πυθμένα των θαλασσών και την παγκοσμία κατανομή αυτών. Εστιάζει έπειτα στη γεωλογική περιγραφή της περιοχής μελέτης και στα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος που μελετήθηκαν, Amsterdam και Kazan. Περιγράφονται, επίσης, οι κύριες διεργασίες

¹ η λέξη οξείδωση γράφεται με διαφορετικό τρόπο (οξειδωση) σε όλα τα βιβλία Χημείας. Ωστόσο για την ορθογραφία των λέξεων ακολουθήθηκε η γραφή που αναφέρεται ως ορθή σύμφωνα με το Λεξικό της Νέας Ελληνικής Γλώσσας, Γ. Μπαμπινιώτη, Β' Έκδοση, 2002

των θαλάσσιων ιζημάτων που σχετίζονται με την παρουσία του μεθανίου και εξετάζονται οι ομάδες των προκαρυωτικών οργανισμών που συμμετέχουν σε κάθε μία από αυτές.

Η παρούσα εργασία εστίασε στην παράλληλη μελέτη δύο υποθαλάσσιων ηφαιστειών λύος, Amsterdam και Kazan που βρίσκονται στην ίδια ευρύτερη γεωγραφική περιοχή και δέχονται την επίδραση της ίδιας υποθαλάσσιας παροχής μεθανίου. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με μερικές μέρες διαφορά και θεωρούνται ταυτόχρονες ενώ ακολουθήθηκε ο ίδιος χειρισμός των ιζημάτων με συλλογή υποδειγμάτων υψηλής κατακόρυφης ανάλυσης. Σε κάθε ένα από τα ηφαιστεια που μελετήθηκαν έγινε εκτεταμένη γεωλογική έρευνα καθώς και πολλαπλές δειγματοληψίες τόσο με τη χρήση κυβωτιοπυρηνολήπτη όσο και με τη χρήση πυρηνολήπτη βαρύτητας. Η επιλογή των πυρήνων που αναλύθηκαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής βασίστηκε στα γεωλογικά και γεωχημικά δεδομένα που προέκυψαν για κάθε μία από τις θέσεις δειγματοληψίας και πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν ενεργές θέσεις.

Στηριζόμενοι στην υπόθεση ότι η χωρική διαφοροποίηση των θέσεων που εξετάστηκαν τόσο σε οριζόντια όσο και σε κατακόρυφη κλίμακα, δημιουργεί διαφορετικά ενδιαφέροντα για την ανάπτυξη βιοκοινοτήτων η έρευνα που περιγράφεται στα επόμενα κεφάλαια προσπαθεί να δώσει απαντήσεις για την κατανομή και τη διαφοροποίηση των προκαρυωτικών κοινοτήτων σε ένα «εξειδικευμένο» περιβάλλον και τους πιθανούς παράγοντες που καθορίζουν την κατανομή αυτή.

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των βιοκοινοτήτων αυτών εξετάζεται στο κεφάλαιο 2 μέσω της ανάλυσης των λιπιδιακών βιοδεικτών. Παρουσιάζεται επίσης, η κατανομή των συγκεντρώσεων του μεθανίου και των θειικών ιόντων στο ίζημα, οι κυριότεροι παράγοντες σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, στη δημιουργία αυτών των βιοκοινοτήτων.

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των βιοκοινοτήτων συζητείται στο κεφάλαιο 3 μέσω της κατασκευής βιβλιοθηκών κλώνων του 16S RNA γονιδίου και της φυλογενετικής ανάλυσης των βιοκοινοτήτων των Bacteria και Archaea που ανιχνεύτηκαν.

Στο κεφάλαιο 4 αναλύεται η βιοποικιλότητα της κάθε βιοκοινότητας και οι πιθανοί παράγοντες που διαμορφώνουν ίδια ή διαφορετικά πρότυπα στην κατανομή των δεικτών βιοποικιλότητας των Bacteria και Archaea. Επίσης, εφαρμόζεται ανάλυση ομαδοποίησης για τη δημιουργία ομάδων ομοιότητας των βιοκοινοτήτων, ώστε να αποκαλυφθούν πιθανές δομικές ομοιότητες μεταξύ τους και να συσχετιστούν αυτές με την πρωταρχική χωρική διαφοροποίηση των ιζημάτων που εξετάστηκαν

Στο κεφάλαιο 5, διερευνάται η λειτουργική ποικιλότητα των Archaea που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του μεθανίου μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης του γονιδίου της αναγωγής του μεθυλοσυνενζύμου M.

Τέλος, στο κεφάλαιο 6, συνοψίζονται τα κυριότερα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κάθε μεθοδολογική προσέγγιση που εφαρμόστηκε και γίνεται σύνθεση αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΘΑΝΙΟ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΙΟΪΔΡΙΤΕΣ

1.1.1 Το μεθάνιο

Για αρκετά χρόνια υπήρχε η πεποίθηση ότι ο θαλάσσιος πυθμένας στερούνταν ζωής πέρα από τη ζώνη που το φως μπορούσε να διεισδύσει. Ωστόσο, ανακαλύψεις που έγιναν τις προηγούμενες τρεις δεκαετίες για την ενεργή αναερόβια βίωση της βαθιάς θάλασσας έχουν αλλάξει την αντίληψη της επιστημονικής κοινότητας για τον ωκεάνιο κύκλο του άνθρακα, στον οποίο το μεθάνιο διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο. Παράλληλα, γεννήθηκαν ερωτήματα για τις πιθανές επιδράσεις του μεθανίου, δραστικού αερίου του θερμοκηπίου, στις πιθανές κλιματικές αλλαγές.

Το μεθάνιο είναι το απλούστερο οργανικό μόριο που ανήκει στα αλκάνια και αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα που συνδέεται ομοιοπολικά με τέσσερα άτομα υδρογόνου και σχηματίζει ένα τετράεδρο. Ο άνθρακας στο μόριο του μεθανίου βρίσκεται στην πιο ανηγμένη του κατάσταση. Το μεθάνιο υπό Κανονικές Συνθήκες είναι άχρωμο και άοσμο αέριο και ελάχιστα διαλυτό στο νερό (~1.5 mM). Η διαλυτότητα αυξάνεται με την υδροστατική πίεση, η αλατότητα όμως, όπως και η θερμοκρασία, έχουν αρνητική επίδραση στη διαλυτότητα (Yamamoto *et al.* 1976).

1.1.1.1 Ισοτοπική σύσταση του μεθανίου

Τρία ισότοπα του άνθρακα απαντώνται συνήθως στη φύση, τα ευσταθή ισότοπα ^{12}C και ^{13}C και το ραδιενεργό ισότοπο, β' ακτινοβολίας ^{14}C , που έχει χρόνο ημιζωής 5730 χρόνια. Ο ^{12}C είναι το πιο άφθονο ισότοπο στη φύση. Διάφορες χημικές και βιολογικές διεργασίες

επιλέγουν μεταξύ των ισότοπων, μέσω των ενζυμικών διεργασιών τους, δεσμεύοντας κατά προτίμηση τα μόρια με το ελαφρύτερο ισότοπο. Ο μηχανισμός αυτός, που δεν έχει διερευνηθεί πλήρως, ονομάζεται ισοτοπική κλασμάτωση και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οργανικών χημικών ενώσεων με αυξημένο ποσοστό ^{12}C ή, διαφορετικά, τελικά προϊόντα απεμπλουτισμένα σε ^{13}C (Madigan *et al.* 2008). Ο λόγος ισοτοπικής κλασμάτωσης των σταθερών ισότοπων ^{12}C και ^{13}C που εκφράζεται ως τιμή $\delta^{13}\text{C}$ δίνει το μέγεθος της προτίμησης του ελαφριού ισότοπου σε σχέση με το παγκόσμια καθιερωμένο πρότυπο [standard] VPDB (Vienna Peedee belemnite) και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}_{\text{sample}} - \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}_{\text{standard}}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}_{\text{standard}}} \cdot 1000$$

1.1.1.2 Προέλευση του μεθανίου

Το μεθάνιο έχει τρεις διαφορετικές πηγές προέλευσης, την αβιογενή, τη θερμογενή και τη μικροοργανισμική. Το προερχόμενο μεθάνιο από κάθε πηγή χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο εύρος $\delta^{13}\text{C}$ και δD^2 τιμών, καθώς επίσης και από το ποσοστό των ανώτερων υδρογονανθράκων (C_{2+}) που συνυπάρχουν και την ισοτοπική τους σύσταση (Whiticar 1999, Lollar *et al.* 2002). Τόσο το αβιογενές όσο και το θερμογενές μεθάνιο παράγονται υπό συνθήκες

² αντίστοιχος λόγος με το $\delta^{13}\text{C}$ που υπολογίζει την ισοτοπική κλασμάτωση του δευτέρου D

υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας. Το αβιογενές μεθάνιο παράγεται από την αναγωγή ανθρακικών ιόντων κατά τη διάρκεια της ψύξης του μάγματος και της σερπεντινοποίησης του εκτεθειμένου περιδοκίτη, ενώ το θερμογενές μεθάνιο σχηματίζεται κατά τη θερμική αποικοδόμηση θαμμένου οργανικού υλικού (Charlou & Donval 1993, Kelley 1996, Horita & Berndt 1999). Το θερμογενές μεθάνιο ονομάζεται επίσης και απολιθωμένο μεθάνιο [fossil methane].

Το αβιογενές μεθάνιο είναι περισσότερο εμπλουτισμένο σε ^{13}C με τιμές που κυμαίνονται από 0 ως -42‰ και δD τιμές από -100‰ ως -450‰ (Horita & Berndt 1999, Kelley & Früh-Green 1999, Whiticar 1999, Lollar *et al.* 2002). Ο σχηματισμός του αβιογενούς μεθανίου μπορεί να καταλύεται από κράμα μετάλλων νικελίου-σιδήρου που έχει ως αποτέλεσμα το χαμηλότερο άκρο των παρατηρούμενων τιμών $\delta^{13}\text{C}$ (Horita & Berndt 1999).

Το θερμογενές μεθάνιο είναι συνήθως πιο ελαφρύ σε ^{13}C με τιμές από -15 ως -55‰ (Whiticar 1999). Εκτός από τις συνθήκες της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του σχηματισμού και το στάδιο ωριμότητας, η ισοτοπική τιμή του θερμογενούς μεθανίου εξαρτάται από τα πρόδρομα μόρια τα οποία τελικά προέρχονται από τη φωτοσύνθεση και για το λόγο αυτό είναι ήδη απεμπλουτισμένο σε ^{13}C (Whiticar 1999).

Ο σχηματισμός τόσο του αβιογενούς όσο και του θερμογενούς μεθανίου συνοδεύεται από το σχηματισμό C_{2+} συστατικών. Ενώ τα θερμογενή C_{2+} μόρια δείχνουν προοδευτικό εμπλουτισμό σε ^{13}C αυξανόμενου του αριθμού ατόμων του άνθρακα, οι $\delta^{13}\text{C}$ τιμές των αβιογενών C_{2+} μορίων δε φαίνεται να δείχνουν αυτή την τάση (Lollar *et al.* 2002). Η μικροοργανισμική

μεθανιογένεση αναπτύσσεται αναλυτικά στην παράγραφο 1.2.

1.1.1.3 Ισοτοπική σύσταση του άνθρακα των λιπιδίων

Πολύτιμες πληροφορίες αντλούνται και από την ισοτοπική σύσταση του άνθρακα των λιπιδίων της μεμβράνης, η οποία είναι χαρακτηριστική της πηγής του άνθρακα και/ή της μεταβολικής οδού που χρησιμοποιείται από τον παραγωγό τους. Όταν παράγεται το μεθάνιο με τη δράση μικροοργανισμών, οι μεθανιογόνοι διακρίνουν μεταξύ του ^{13}C και του ^{12}C ως υπόστρωμα, λόγω της χαμηλότερης δραστηριότητας του βαρύτερου μορίου έχοντας ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό σε ^{12}C του μεθανίου που παράγεται (Whiticar, 1999). Κατά τη διάρκεια της κατανάλωσης του ισοτοπικά ελαφριού μεθανίου από τους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς, ένα δεύτερο βήμα ισοτοπικής κλασμάτωσης του άνθρακα εμπλέκεται. Έτσι, ο άνθρακας που ενσωματώνεται στη βιομάζα των μεθανιότροφων μικροοργανισμών και έχει ως πηγή τον 'ελαφρύ' άνθρακα παρουσιάζει πολύ μικρή τιμή του $\delta^{13}\text{C}$.

Στην αναζήτηση των οργανισμών που εμπλέκονται στην AOM, οι επιστήμονες ανακάλυψαν λιπίδια ειδικά για τους μεθανιογόνους: κροκετάνη, αρχαιόλη και υδροξυαρχαιόλη (Elvert *et al.* 1999, Hinrichs *et al.* 1999, Pancost *et al.* 2000, Thiel *et al.* 2001) με πολύ ελαφριά ισοτοπική σύσταση άνθρακα. Αυτά τα λιπίδια, προερχόμενα από τα Archaea, βρέθηκαν μαζί με ισοτοπικά ελαφριά (-50 ως -100‰) χαρακτηριστικά λιπίδια Bacteria. Ο σχετικός αυτός απεμπλουτισμός σε ^{13}C δείχνει τη συγχώνευση άνθρακα προερχόμενο από μεθάνιο και στα μεμβρανικά λιπίδια των Bacteria.

1.1.1.4 Σημασία του μεθανίου

Το μεθάνιο είναι το κύριο συστατικό στην ατμόσφαιρα του Δία, του Κρόνου, του Ουρανού και του Πλούτωνα (Beyer & Walter 1997). Η συγκέντρωση του μεθανίου στην ατμόσφαιρα της Γης είναι κατά μέσο όρο 1.7 ppm (Nakaya *et al.* 2000). Η συγκέντρωση αυτή έχει υπερδιπλασιαστεί από το 1800 (Etheridge *et al.* 1998, Petit *et al.* 1999). Αυτή η αύξηση συμπίπτει με την απαρχή της βιομηχανικής εποχής και προχωράει σχεδόν παράλληλα με την παγκόσμια αύξηση του πληθυσμού, υποδεικνύοντας ανθρωπογενή αίτια για αυτό το φαινόμενο.

Το μεθάνιο έχει την ικανότητα να παγιδεύει και να επανεκπέμπει την υπεριώδη ακτινοβολία. Ανήκει επομένως στα αέρια του θερμοκηπίου και είναι υπεύθυνο για την παγκόσμια υπερθέρμανση του πλανήτη. Το μεθάνιο είναι 23 φορές πιο αποτελεσματικό στον εγκλωβισμό της θερμότητας σε σχέση με το διοξείδιο του άνθρακα. Σήμερα, η συνεισφορά του μεθανίου στην παγκόσμια υπερθέρμανση ανέρχεται στο 20% (Manne & Richels 2001, Wuebbles & Hayhoe 2002).

Μετά το πετρέλαιο και το κάρβουνο, το φυσικό αέριο είναι από τις κύριες πηγές ενέργειας της ανθρώπινης κοινωνίας. Το μεθάνιο αποτελεί το 95% του φυσικού αερίου σε δεξαμενές απολιθωμένων καυσίμων. Τα απολιθωμένα καύσιμα δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια χιλιάδων ετών από αποθέσεις οργανικού υλικού σε υδάτινα συστήματα. Ωστόσο, εκτός από παλιές αποθέσεις μεθανίου, υπάρχουν πολλές πρόσφατες πηγές μεθανίου στη γη, όπως η εκτροφή βοοειδών, η παραγωγή ρυζιού και η καύση βιομάζας (Reeburgh 1996, Judd *et al.* 2002).

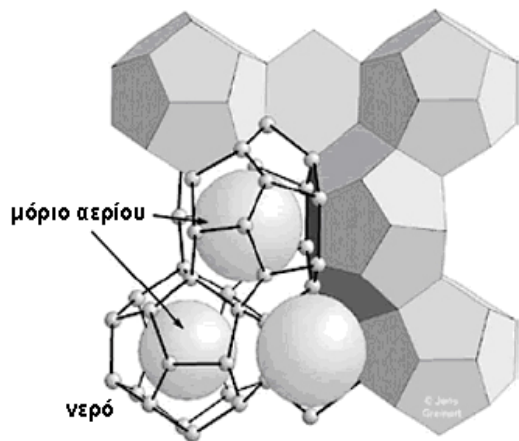
1.1.2 Οι μεθανιοϋδρίτες

Οι μεθανιοϋδρίτες ή αλλιώς κοιτάσματα ενυδατωμένων υδρογονανθράκων³ είναι γνωστοί από το 19^ο αιώνα σε πειράματα που έγιναν από τον Sir Humphrey Davy. Ωστόσο, θεωρούνταν «χημικά παράδοξα» για αρκετά χρόνια έως ότου προκάλεσαν σοβαρά προβλήματα στη βιομηχανία εξορύξεως πετρελαίου τη δεκαετία του '30, όταν ο σχηματισμός μεθανιοϋδριτών απέφρασε τους σωλήνες μεταφοράς πετρελαίου (Hammerschmidt 1934). Σήμερα είναι γνωστές πολλές φυσικές πηγές μεθανιοϋδριτών από τους αιώνιους πάγους ως τη βαθιά θάλασσα και οι μεθανιοϋδρίτες αποτελούν τη μεγαλύτερη, γνωστή, δεξαμενή μεθανίου στη Γη (Kvenvolden *et al.* 1984, Kvenvolden 1993a, Makogon *et al.* 1998, Borowski *et al.* 2000, Kvenvolden & Lorenson 2001).

1.1.2.1 Σύσταση και δομή των μεθανιοϋδριτών

Οι μεθανιοϋδρίτες, είναι στερεές, μη στοιχειομετρικές, ενώσεις που περιέχουν συμπαγείς κρυστάλλους αερίου, νερού και άλλων μορίων. Το αέριο, κυρίως μεθάνιο, είναι εγκλωβισμένο σε ένα τρισδιάστατο, άκαμπτο, πλέγμα κλωβών που σχηματίζεται από τα μόρια του νερού (Kvenvolden *et al.* 1984, Englezos 1992, Sloan 1997, Sloan 1998) (Εικόνα 1.1).

³ και οι δύο όροι χρησιμοποιούνται ισοδύναμα για να αποδώσουν στα ελληνικά τον αγγλικό όρο gas hydrates. Πρόκειται για κρυστάλλους νερού που περιέχουν φυσικό αέριο. Κυρίως μόρια μεθανίου και σε μικρότερες ποσότητες μόρια προπανίου, ισοβουτανίου, αλλά και CO₂ ή H₂S. Ο όρος κοιτάσματα ενυδατωμένων υδρογονανθράκων ίσως είναι πιστότερη απόδοση του αγγλικού όρου, ωστόσο στο κείμενο χρησιμοποιείται για λόγους συντομίας ο όρος μεθανιοϋδρίτες.

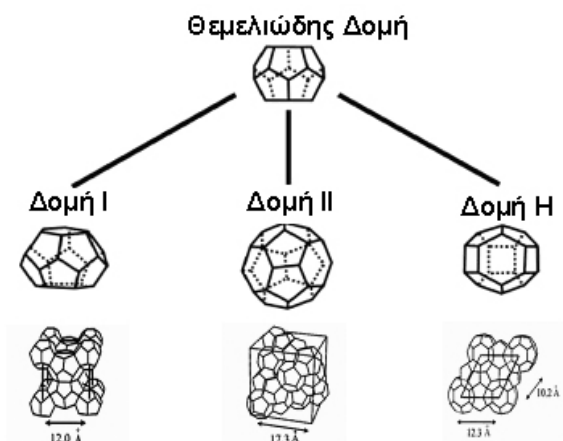


Εικόνα 1.1 Μοντέλο της κρυσταλλικής δομής (τύπου I) των μεθανιοϋδριτών (τροποποιημένη από Bohrmann & Torres 2006)

Τρεις δομές κλωβών απαντώνται στη φύση: δομή I, II και H, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.2 (Bohrmann & Torres 2006). Ικανή ποσότητα μορίων αερίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό μεθανιοϋδριτών, ενώ η δομή που θα σχηματιστεί εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση του αερίου. Η δομή I, που είναι η πιο κοινή απαντώμενη στις θαλάσσιες αποθέσεις, περιέχει μικρά μόρια, όπως CH_4 , CO_2 ή H_2S . Η δομή II εγκλείει μεγάλα αέρια μόρια όπως προπάνιο και ισοβουτάνιο, ενώ η δομή H αποτελείται από κλωβούς που απαιτούν ακόμη μεγαλύτερα μόρια, όπως το μεθυλοκυκλοεξάνιο, για το σχηματισμό τους.

Οι θαλάσσιοι μεθανιοϋδρίτες κυρίως υπάρχουν με τη δομή I και το μεθάνιο ως πιο σημαντικό αέριο συστατικό (Kvenvolden 1993b). Σε περιοχές αναβλύσεων πετρελαιοειδών, όπως ο Κόλπος του Μεξικού, έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός υδριτών τύπου II με μεθάνιο και ανώτερους υδρογονάνθρακες (Sassen *et al.* 1999).

Και οι τρεις δομές, όταν όλοι οι κλωβοί εμπεριέχουν αέριο, έχουν όμοιες συγκεντρώσεις από 85% mol νερό και 15% mol



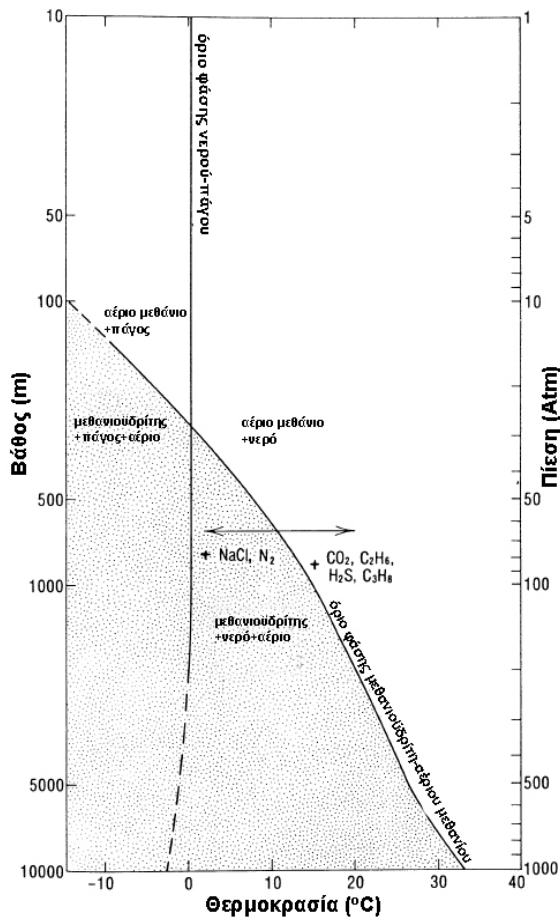
Εικόνα 1.2 Δομές κρυστάλλων μεθανιοϋδριτών τύπου I, II και H (τροποποιημένη από Bohrmann & Torres 2006)

αερίου. Όταν ένας μεθανιοϋδρίτης αποσυντίθεται από 1m^3 μεθανιοϋδρίτη απελευθερώνονται, λόγω της εκτόνωσης του αερίου 164m^3 μεθανίου, ενώ το νερό που απομένει έχει όγκο 0.8m^3 (Kvenvolden 1993b).

1.1.2.2 Σχηματισμός και σταθερότητα των μεθανιοϋδριτών

Ο σχηματισμός και η σταθερότητα των μεθανιοϋδριτών ελέγχεται από τη θερμοκρασία, την πίεση και την ιονική ισχύ του νερού, καθώς και τη σύνθεση και συγκέντρωση των αερίων που εγκλωβίζονται (Kvenvolden 1993b, Sloan 1998). Σε ατμοσφαιρική πίεση, οι μεθανιοϋδρίτες σχηματίζονται σε πολύ κρύες περιοχές, όπως στους αιώνιους πάγους. Στους ωκεανούς, οι μεθανιοϋδρίτες σχηματίζονται και σταθεροποιούνται σε υψηλή υδροστατική πίεση και/ή σε χαμηλή θερμοκρασία.

Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζονται οι συνθήκες σταθεροποίησης των μεθανιοϋδριτών. Το χαμηλότερο όριο της ύπαρξης των μεθανιοϋδριτών στα θαλάσσια ιζήματα καθορίζεται από τη γεωθερμική διαβάθμιση. Κάτω από αυτή τη ζώνη, υπάρχει ελεύθερο αέριο.



Εικόνα 1.3 Το διάγραμμα φάσεων που απεικονίζει το όριο μεταξύ του ελεύθερου αερίου μεθανίου και του μεθανιοϋδρίτη για σύστημα καθαρού νερού-μεθανίου. Η προσθήκη NaCl στο νερό μετατοπίζει την καμπύλη αριστερά, ενώ η προσθήκη CO₂, H₂S, C₂H₆, C₃H₈ στο μεθάνιο μετατοπίζει το όριο δεξιά, αυξάνοντας την περιοχή σταθεροποίησης των μεθανιοϋδριτών (τροποποιημένη από Kvenvolden, 1993)

1.1.2.3 Μεθανιοϋδρίτες και ισοζύγιο του μεθανίου

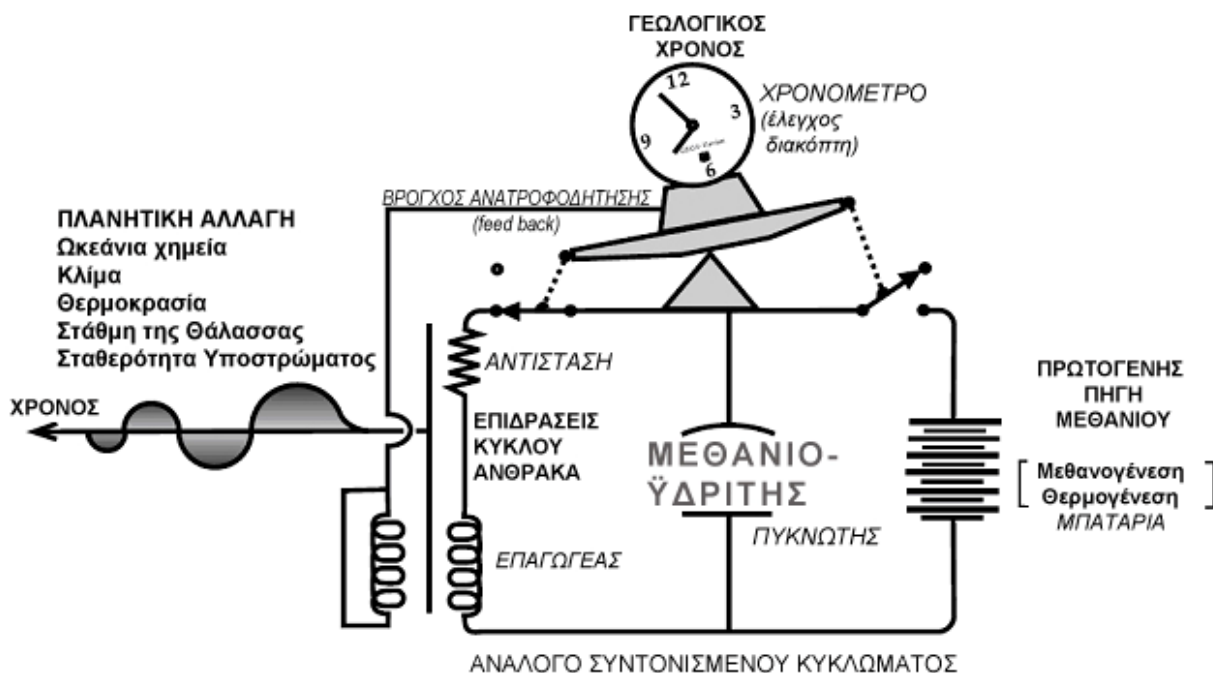
Η γνώση των επιστημόνων για το ρόλο των μεθανιοϋδριτών στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή παραμένει ελλιπής καθώς η ακριβής ποσότητα των υδρογονωμένων υδρογονανθράκων που υπάρχουν σε παγκόσμια κλίμακα είναι άγνωστη (Kvenvolden 2002). Επίσης, η συνεισφορά των μεθανιοϋδριτών στο ισοζύγιο του μεθανίου στη ατμόσφαιρα δεν μπορεί να υπολογιστεί

επακριβώς καθώς δεν έχει αποσαφηνιστεί το ποσοστό του μεθανίου ενός μεθανιοϋδρίτη σε αποσύνθεση που φτάνει σε αυτή (Valentine *et al.* 2001).

Ωστόσο, το ισοζύγιο του μεθανίου περιγράφεται απλοποιημένα με το ανάλογο ενός συντονισμένου κυκλώματος με τους μεθανιοϋδρίτες στο ρόλο του πυκνωτή (Kvenvolden 2002, Dickens 2003). Οι πηγές του μεθανίου αποτελούν τη μπαταρία του συστήματος που το τροφοδοτούν. Οι μεθανιοϋδρίτες, λειτουργούν ως πυκνωτής που αποθηκεύει ή απελευθερώνει μεθάνιο και η αντίσταση όπως και το πηνίο αναπαριστούν με αδρό τρόπο πιθανές επιπτώσεις από την απελευθέρωση του μεθανίου (Εικόνα 1.4).

Το ρολόι ελέγχει το χρόνο που «ανοιγοκλείνουν» τα δύο κυκλώματα και πιθανά επιδέχεται ανάδραση από το μεθάνιο που αποθηκεύεται ή απελευθερώνεται αντίστοιχα. Όταν ο διακόπτης είναι κλειστός από τη μεριά της μπαταρίας (άρα ανοιχτός από την πλευρά του πηνίου), ο πυκνωτής μεθανιοϋδρίτης αποθηκεύει μεθάνιο, ενώ όταν ο διακόπτης κλείσει από την άλλη πλευρά απελευθερώνεται μεθάνιο απελευθερώνει μεθάνιο σε πηνίο και αντίσταση, οδηγώντας σε πιθανές αλληλοσχετιζόμενες συνέπειες όπως αλλαγές στη χημεία του ωκεανού, τη θερμοκρασία, τη στάθμη της θάλασσας και την ποσότητα των παγετώνων.

Οι συζευγμένοι διακόπτες ρυθμίζουν τη ροή του μεθανίου μεταξύ των δύο κυκλωμάτων. Δεν είναι γνωστό ακόμα σε ποιο βαθμό οι μεθανιοϋδρίτες προκαλούν αυτές τις αλλαγές ή επηρεάζονται από αυτές, αλλά οι διακόπτες συνεχίζουν να ανοίγουν και να κλείνουν κατά τη διάρκεια του γεωλογικού χρόνου και μεθάνιο αποθηκεύεται ή απελευθερώνεται μέσω των μεθανιοϋδριτών. Η προσπάθεια των επιστημόνων, με



Εικόνα 1.4 Ανάλογο ηλεκτρικού συντονισμένου κυκλώματος για το ρόλο των μεθανιοϋδριτών στον πλανητικό κύκλο του άνθρακα. Το απλοποιημένο σχέδιο δείχνει τις πιθανές αλληλοσχετιζόμενες συνέπειες από το σχηματισμό και την αποσύνθεση των μεθανιοϋδριτών κατά το γεωλογικό χρόνο (τροποποιημένη από Kvenvolden 2002)

διεπιστημονικές προσεγγίσεις, έχει εστιαστεί στους παράγοντες που επηρεάζουν την κατεύθυνση λειτουργίας των κυκλωμάτων και στους παράγοντες που ανατροφοδοτούν το σύστημα, ώστε να κατανοηθούν οι συνιστώσες που επιδρούν στο σύστημα και να ποσοτικοποιηθούν οι αντίστοιχες αλλαγές στο παγκόσμιο σύστημα (Kvenvolden 2002).

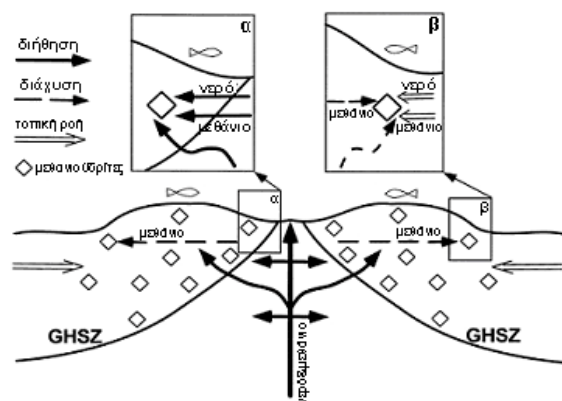
1.1.3 Ηφαίστεια ιλύος

Τα φαινόμενα κινητικότητας ιλύος που περιλαμβάνουν εκχύσεις ιλύος (διάπυρα ιλύος) και εκροές ιλύος (ηφαίστεια ιλύος) είναι κοινά παγκοσμίως. Ο όρος ηφαιστειακότητα ιλύος αναφέρεται σε μία συστοιχία ιζηματογενών διεργασιών που έχουν ως αποτέλεσμα την προεκβολή αργιλώδους υλικού στην επιφάνεια της Γης ή στον πυθμένα της θάλασσας (Higgins & Saunders 1974, Barber & Brown 1988, Ginsburg & Soloviev 1994). Το εξωθούμενο

υλικό αποτελείται από ένα μίγμα παχύρευστου λεπτόκοκκου ιζήματος, νερού και αερίων που συμπαρασύρει θραύσματα του μητρικού πετρώματος. Ονομάζεται διάπυρο μίγμα [diapiric mélange], ή συνθέστερα λατυποταγής ιλύς [mud breccia] (Cita *et al.* 1981) και δημιουργεί χαρακτηριστικές εκρέουσες μάζες ή ροές ιλύος. Σχηματίζονται έτσι γεωλογικές δομές, τοπογραφικές ανυψώσεις διαφορετικών μεγεθών και σχημάτων, που παρουσιάζουν αναλογία στη μορφολογία και ενεργότητα των πυριγενών ηφαιστειών και γι αυτό ονομάζονται ηφαίστεια ιλύος (O'Brien 1968, Higgins & Saunders 1974, Cita *et al.* 1981, Milkov 2000).

Συνήθως, η ιλύς εκβάλλει από ένα κεντρικό αγωγό ή κανάλι τροφοδοσίας και σε μερικές περιπτώσεις από δευτερεύοντες αγωγούς ή κρατήρες. Κατά διαστήματα, μεγάλες καταστροφικές εκρήξεις ιλύος μπορεί να συμβούν. Εκπομπές ρευστού υλικού συχνά

συνοδεύουν το φαινόμενο, αλλά μπορεί να συμβούν και εξωτερικά των ηφαιστειών υλός κατά μήκος βαθέν ρηγμάτων. Αέρια εξωθούνται είτε ως ελεύθερο αέριο στην περίπτωση των χερσαίων ηφαιστειών ή διαλυμένο στο νερό του ιζήματος και/ή ως μεθανιοϋδρίτες (Εικόνα 1.5) στην περίπτωση των υποθαλάσσιων ηφαιστειών υλός (Reed *et al.* 1990, Milkov 2000).



Εικόνα 1.5 Σχηματισμός μεθανιοϋδριτών στα ιζήματα των ηφαιστειών υλός [GHSZ: ζώνη σταθεροποίησης μεθανιοϋδριτών] (τροποποιημένη από Milkov 2000)

1.1.3.1 Σημασία των ηφαιστειών υλός

Αξιοσημείωτο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας από τα τέλη της δεκαετίας του 70' στην μελέτη και τον εντοπισμό υποθαλάσσιων ηφαιστειών. Οι λόγοι που οδήγησαν σε αυτή την κούρσα ανακαλύψεων υποθαλάσσιων ηφαιστειών υλός είναι πολλοί. Τα εκλούμενα αέρια (κυρίως μεθάνιο και υδρόθειο) σε συνδυασμό με το υψηλής θερμότητας εκλούμενο νερό του πυθμένα καθώς επίσης και το μεγάλο ποσό φυσικού αερίου με τη μορφή μεθανιοϋδριτών αποτελούν δυνητικώς αξιοποιήσιμες ενεργειακές πηγές (Hovland 2000, Milkov & Sassen 2002), ενώ παράλληλα, αποτελούν σημαντική πηγή ή δυνητική πηγή ροής μεθανίου από την λιθόσφαιρα στην υδρόσφαιρα και στην ατμόσφαιρα

προκαλώντας επιπτώσεις στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και επιφέροντας πλανητικές αλλαγές (Dimitrov 2002, Milkov & Sassen 2003).

Τέλος, τα ιζήματα και τα άλλα ρευστά υλικά που εκχύνονται από τα ηφαιστεια υλός, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την γεωλογία και την γεωχημεία των περιοχών αυτών καθώς και πληροφορίες για την κατανομή των ιζημάτων ενώ οι μεθανιοϋδρίτες λειτουργούν ως αξιόπιστος δείκτης εύρεσης κοιτασμάτων πετρελαίου (Milkov 2000).

1.1.3.2 Κατανομή των ηφαιστειών υλός

Ηφαιστεια υλός βρίσκονται σχεδόν παντού στον κόσμο. Οι Higgins και Saunders (1974) ανέφεραν πολλές περιπτώσεις ηφαιστειών υλός, αλλά τουλάχιστον οι διπλάσιες είναι σήμερα γνωστές. Αυτό οφείλεται στον αυξανόμενο αριθμό υποθαλάσσιων ηφαιστειών που ερευνηθήκαν χάρη στην ευρεία χρήση προηγμένου εξοπλισμού υποθαλάσσιας εξερεύνησης τα τελευταία 15 χρόνια. Όμως είναι πολύ πιθανό ένας μεγάλος αριθμός ηφαιστειακών πεδίων υλός να μην έχει ανακαλυφθεί ακόμα.

Ηφαιστεια υλός και πηγές υγρών υλικών κυριαρχούν στα ενεργά γεωλογικά περιθώρια. Απαντώνται κυρίως στη ζώνη σύγκρουσης Άλπεων-Ιμαλαΐων, που εκτείνεται από τη Μεσόγειο Θάλασσα (Cita *et al.* 1981, Robertson 1996, Woodside *et al.* 1997, Limonov *et al.* 1998), πάνω από τη Μαύρη και την Κασπία Θάλασσα (Ivanov *et al.* 1992, Woodside *et al.* 1998), τη χερσόνησο Καμέας και Ταμάν, το Αζερμπαϊτζάν, το οποίο έχει το μεγαλύτερο χερσαίο ηφαιστειο υλός (Hovland *et al.* 1997, Fowler *et al.* 2000), το Τουρκμενιστάν και το Ιράν, μέχρι την ακτή του Μακράν (Wiedicke *et al.* 2001). Νοτιότερα, ηφαιστεια υλός βρίσκονται κατά μήκος των ζωνών σύγκρουσης στα περισσότερα μέρη του Ινδικού Ωκεανού και

κατά μήκος της Ινδονησίας και του τόξου νησιών Μπάντα (Wiedicke *et al.* 2002). Ηφαίστεια ιλύος απαντώνται στη Σουμάτρα, στο Βόρνεο (Van Rensbergen *et al.* 1999), στο Τιμόρ (Barber *et al.* 1986), στην Ταϊβάν και στην τάφρο Νανκάι (Chamot-Rooke *et al.* 1992). Πολυάριθμα ηφαίστεια ιλύος υπάρχουν στο πρίσμα συσσώρευσης των Μπαρμπέντος (Brown & Westbrook 1988, Le Pichon 1990) στο Τρινιδάδ και τις ζώνες ώσης της νότιας Καραϊβικής (Reed *et al.* 1990, Vernet *et al.* 1992), καθώς και κατά μήκος της βορειοανατολικής ακτής της Αμερικής (Orange *et al.* 1999).

Στα παθητικά γεωλογικά περιθώρια, τα ηφαίστεια ιλύος σχετίζονται κυρίως με περιβάλλοντα υψηλού ρυθμού ιζηματοποίησης όπως οι αναρριπίδες βαθιάς θάλασσας και τα εκβολικά συστήματα: στο δέλτα του Νίγηρα (Graue 2000), στον Κόλπο του Μεξικού (Sager *et al.* 2003), στο βαθύ εκβολικό σύστημα του Νείλου (Loncke & Mascle 2004) και στη θάλασσα της Νορβηγίας (Vogt *et al.* 1999). Επίσης συναντώνται σε περιθώρια με χαμηλότερους ρυθμούς ιζηματοποίησης, όπως τη θάλασσα του Αλμποράν (Pérez-Belzuz *et al.* 1997) και του Κόλπου του Καντίζ (Mazurenko *et al.* 2002). Τα περισσότερα από τα ηφαιστειακά πεδία ιλύος σχετίζονται στενά με περιοχές όπου έχουν δημιουργηθεί ή δημιουργούνται υδρογονάνθρακες.

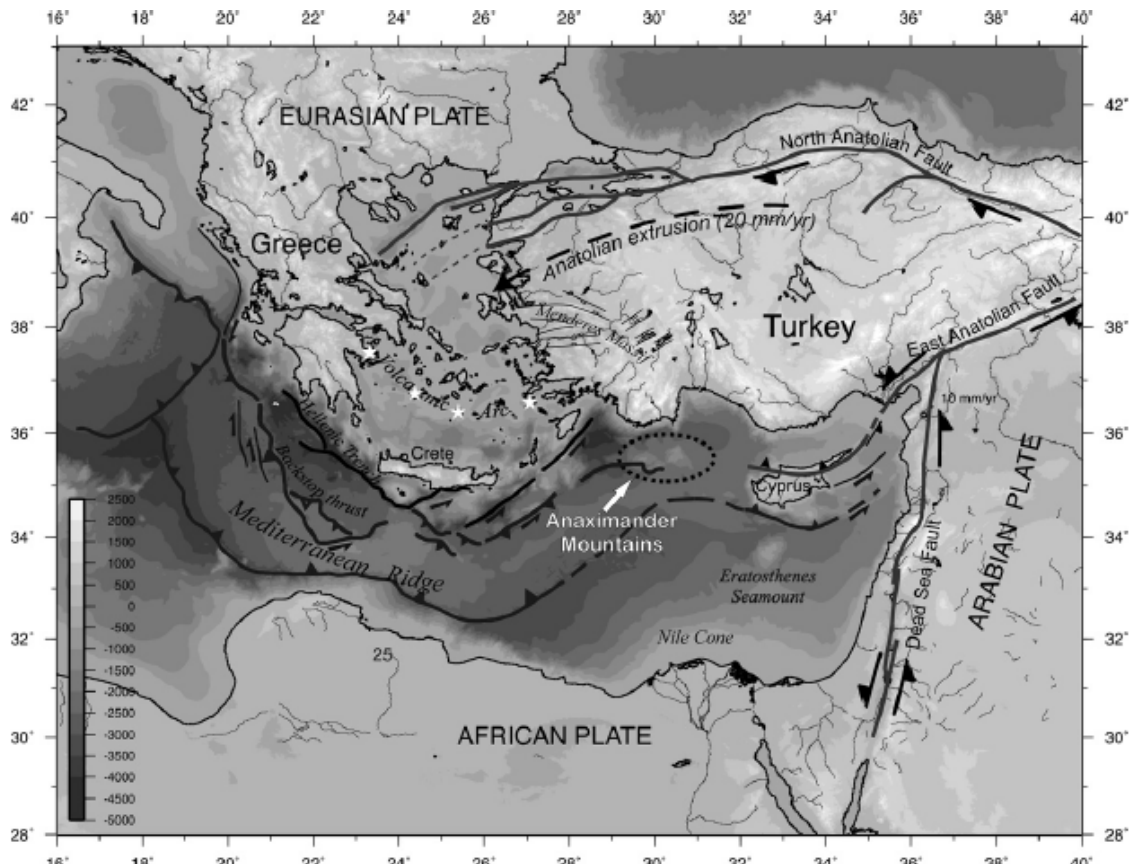
1.1.3.3 Ηφαίστεια ιλύος στην Ανατολική Μεσόγειο

Μετά την αρχική ανακάλυψη των πρώτων υποθαλάσσιων ηφαιστειών ιλύος [Mud Volcanoes, MV] της Ανατολικής Μεσογείου στα τέλη της δεκαετίας του '70 (Cita *et al.* 1981), βρέθηκαν και άλλα ηφαίστεια ιλύος και αναβλύσεις ρευστού υλικού στην περιοχή. Τα περισσότερα βρέθηκαν (Εικόνα 1.6) στο πρίσμα

συσσώρευσης ιζήματος του Ελληνικού Τόξου, στη Μεσογειακή Τάφρο και στο πεδίο Ορέων του Αναξίμανδρου (Woodside *et al.* 1998) καθώς επίσης και παράκτια της Σικελίας (Holland *et al.* 2003), στο εκβολικό σύστημα βαθιάς θάλασσας του Νείλου (Loncke & Mascle 2004), αλλά και κατά μήκος της Ανύψωσης της Φλωρεντίας (Zitter *et al.* 2003) όπως και στο νοτιοανατολικό Αιγαίο Πέλαγος (Perissoratis *et al.* 1998).

Το πεδίο Ορέων του Αναξίμανδρου περιλαμβάνουν μία ομάδα τριών κυρίως ορέων που βρίσκονται μεταξύ του Κυπριακού και του Ελληνικού Τόξου. Στην παρούσα φάση υφίστανται νεοτεκτονική παραμόρφωση που χαρακτηρίζεται από σύγκλιση (Zitter *et al.* 2003, Ten Veen *et al.* 2004, Zitter *et al.* 2005) μεταξύ της δυτικά κινούμενης τεκτονικής Πλάκας της Ανατολίας και της Αφρικανικής Τεκτονικής Πλάκας. Τα Όρη του Αναξίμανδρου περιγράφονται ως μεγάλα διαρρηγμένα και κεκλιμένα τεμάχια που αρχικά είχαν γεωλογική συνέχεια με τη νοτιοδυτική Τουρκία. Όλη η περιοχή υφίσταται μία πολύπλοκη, πολυφασική παραμόρφωση στη νεοτεκτονική της ανάπτυξη (Ten Veen *et al.* 2004).

Κινηματική αλλαγή στο όψιμο Μειόκαινο που σχετίζεται με την απαρχή της προς δυσμάς κίνησης της Ανατολίας καθόρισε την αρχή της διαφορικής υποχώρησης που είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των ορέων του Αναξίμανδρου (Ten Veen *et al.* 2004). Η παραμόρφωση Πλειόκαινου-Τεταρτογενούς ανέπτυξε transtensional πιέσεις στα δυτικά όρη του Αναξίμανδρου αλλά πιο transpressional τεκτονική στα ανατολικά (Ten Veen *et al.* 2004, Zitter 2006). Η παρούσα δομή της περιοχής του Αναξίμανδρου αντικατοπτρίζει μείζουσα ρήξη αλλά το νεοτεκτονικό τους ύψος οφείλεται στη σύγκλιση των πλακών (Woodside *et al.* 1997).



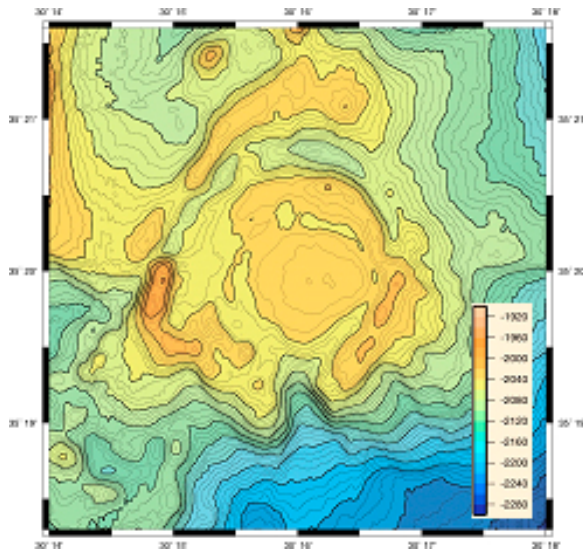
Εικόνα 1.6 Χάρτης της Ανατολικής Μεσογείου. Επισημαίνεται η περιοχή μελέτης των ορέων του Αναξιμανδρου (από Lykousis *et al.* 2009)

Έτσι, στην περιοχή του Αναξιμανδρου επικρατεί πολύπλοκο τεκτονικό καθεστώς που διαμορφώνεται από τις σχετικές κινήσεις των τεκτονικών πλακών της Αφρικής και Ευρασίας (Ten Veen *et al.*, 2004; Zitter *et al.*, 2003).

1.1.3.4 Το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam

Το Amsterdam MV είναι το μεγαλύτερο ηφαίστειο ιλύος της περιοχής του Αναξιμανδρου. Είναι κυκλικού σχήματος, ύψους 100 m, επίπεδης κορυφής και βρίσκεται 2025 m, κατά μέσο όρο, κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας (Εικόνα 1.7). Στην περιφέρειά του σχηματίζεται μια δακτυλιοειδής καταβύθιση, δημιουργώντας μια σχετικά βαθιά (50 m) τάφρο προς βορρά (Zitter 2006, Lykousis *et al.* 2009).

Η επίπεδη τοπογραφία του Amsterdam MV μοιάζει με «πίτα ιλύος», τύπος που αναγνωρίστηκε αρχικά στο σύμπλεγμα των Μπαρμπέϊντος (Le Pichon 1990), όπου ο όρος «πίτα ιλύος» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει μεγάλη συσσώρευση ιλύος με επίπεδη κορυφή που καλύπτει περισσότερο από 50% της συνολικής επιφάνειας του ηφαιστείου ιλύος (Le Pichon 1990, Henry *et al.* 1996). Οι πίτες ιλύος πιστεύεται ότι δημιουργούνται από πιο υδαρή ιλύ σε σχέση με τα κωνικά ηφαίστεια ιλύος (Lance *et al.* 1998). Οι πίτες ιλύος συχνά παρουσιάζουν ομόκεντρη ζωνοποίηση της ενεργότητας, όπως η επιφανειακή κατανομή της πανίδας (Lance *et al.* 1998).



Εικόνα 1.7 Το υποθαλάσσιο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam (τροποποιημένη από Lykousis *et al.* 2009)

Λεπτομερής μορφολογική ανάλυση του Amsterdam MV αποκάλυψε ότι υπάρχουν δύο διακριτοί κρατήρες, ο «εξωτερικός» και ο «εσωτερικός» που συνενώνονται στο νοτιοανατολικό τμήμα τους. Και οι δύο είναι σχεδόν κυκλικού σχήματος με διαστάσεις 6x5 km και 4x3,3 km, αντίστοιχα, ελαφρά διευρυμένοι στη διεύθυνση Β-Ν. Ένα κοινό μορφολογικό χαρακτηριστικό είναι ότι και οι δύο κρατήρες είναι ανοιχτοί στο νοτιότερο τμήμα τους και επικοινωνούν με την πλευρά του ηφαιστείου με ένα φαράγγι πλάτους 400 m επεκτεινόμενο ως το βάθος των 2250 m. Η εσωτερική πλευρά του «εσωτερικού» πυρήνα παρουσιάζει ανάγλυφο μικρότερο από 40 m (Lykousis *et al.* 2009).

Ενδείξεις για σημαντικές εκρήξεις ρευστών έχουν παρατηρηθεί με πολυάριθμες αναβλύσεις που αναγνωρίστηκαν λόγω του πολύ σκούρου μαύρου-μωβ χρώματος των αναγωγικών ιζημάτων και των εκτεταμένων αποθέσεων (έκτασης 2-3 m και πάχους δεκάδων εκατοστών) από κρούστες ανθρακικού ασβεστίου. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί θέσεις παρουσίας Διθύρων (*Mytilidae*, *Esicomyidae*, *Lucinidae* and και *Thyasiridae*), Γαστεροπόδων

και Πολυχαίτων κυρίως στην ανατολική πλευρά του πλατώματος (Perissoratis 2005, Zitter 2006). Ο κύριος αγωγός τροφοδοσίας πιστεύεται ότι βρίσκεται στο κέντρο του πλατώματος (N35° 20', E30° 16') και πιστεύεται ότι πρόκειται για πολύ πρόσφατη ροή ιλύος με ενεργές ρευστές αναβλύσεις (Zitter 2006).

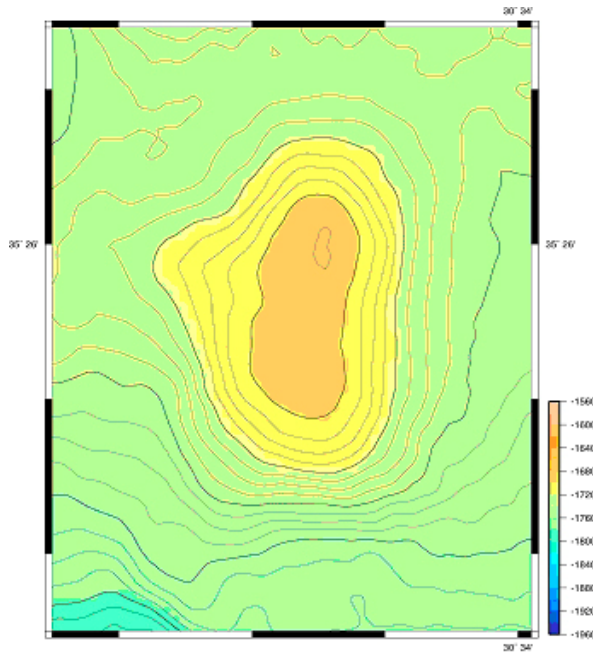
Στο Amsterdam MV έχουν βρεθεί κοιτάσματα ενυδατωμένων υδρογονανθράκων (Zitter 2006, Lykousis *et al.* 2009). Ανακαλύφθηκαν σε σχετικά μικρό βάθος μέσα στο θαλάσσιο πυθμένα του ηφαιστείου ιλύος (0,3-1,5 mbsf⁴) με διάμετρο που κυμάνθηκε από 0,3 ως 8 cm (Lykousis *et al.* 2009) και έχουν κρυσταλλική δομή τύπου II. Οι μεθανιοϋδρίτες του Amsterdam MV χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό μεθανίου (C1 περίπου 96,5%) και σχετικά μεγάλο ποσοστό αιθανίου (C2 περίπου 3%). Οι υδρογονάνθρακες μεγαλύτερου μοριακού βάρους καθώς και το CO₂ βρίσκονται σε αμελητέα ποσότητα. Ο υπολογισμός του λόγου⁵ των συστατικών του αερίου καθώς και του λόγου ισοτοπικής κλασμάτωσης του μεθανίου, οδήγησε στο χαρακτηρισμό του αερίου ως κυρίως θερμογενούς προέλευσης (Perissoratis 2005)

1.1.3.5 Το ηφαίστειο ιλύος Kazan

Το Kazan MV είναι ένας απομονωμένος λόφος με ύψος 50 m που βρίσκεται στην άκρη ενός σχετικά επίπεδου πλατώματος με μέσο βάθος 1750 m. Είναι ένας ελλειπτικού σχήματος θόλος με διαστάσεις 0,6x0,9 km διαταγμένος στη διεύθυνση Β-Ν (Εικόνα 1.8). Σε λεπτομερείς μορφολογικές εικόνες φάνηκε ότι η ελλειπτική δομή σχηματίζεται από καταβύθιση (Lykousis *et al.* 2009).

⁴ m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας [below sea floor, bsf]

⁵ C1/(C2+C3)



Εικόνα 1.8 Το υποθαλάσσιο ηφαιστειο ιλύος Kazan (τροποποιημένη από Lykousis *et al.* 2009)

Στο Kazan MV έχουν παρατηρηθεί ενδείξεις πολλαπλών επεισοδίων έκρηξης. Στο νοτιοδυτικό τμήμα περιοχές έντονα ενεργών αναβλύσεων έχουν ανακαλυφθεί. Σε αυτές τις περιοχές έχουν καταγραφεί Δίθυρα και σωληνοειδείς Πολύχαιτοι (Salas & Woodside 2002, Olu-Le Roy *et al.* 2004) ενώ σε ορισμένα σημεία, αναγωγικά ιζήματα παρατηρήθηκαν συνοδευόμενα από λευκές κηλίδες που πιστεύεται ότι είναι τάπητες μικροοργανισμών (Zitter 2006). Οι μεθανιοϋδρίτες που ανακαλύφθηκαν στο Kazan MV είχαν μέγεθος ρυζιού και ήταν κανονικά κατανεμημένοι σε βάθος μεγαλύτερο από 0,3 mbsf (Lykousis *et al.* 2009).

1.2 ΤΟ ΜΕΘΑΝΙΟ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΙΖΗΜΑΤΑ

Η ροή του μεθανίου στο ίζημα ελέγχεται από μικροοργανισμούς μέσω της Αερόβιας Οξείδωσης του Μεθανίου [Aerobic Oxidation of Methane, O_xM] στον ορίζοντα των ιζημάτων που υπάρχουν αερόβιες συνθήκες και μέσω Αναερόβιας Οξείδωσης του Μεθανίου στον ορίζοντα των ιζημάτων που επικρατούν ανοξικές συνθήκες, διεργασία που είναι συζευγμένη με τη Θεική Αναγωγή [Sulfate Reduction, SR]. Μπορεί, όμως, να παράγεται και από μικροοργανισμούς μέσω της Μικροοργανισμικής Μεθανιογένεσης [Methanogenesis]. Το ποσό του μεθανίου που απελευθερώνεται τελικά από το ίζημα οξιδώνεται στη στήλη που νερού ενώ το υπόλοιπο διαφεύγει στην ατμόσφαιρα.

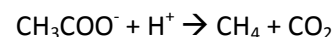
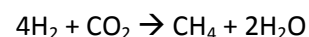
1.2.1 Μεθανιογένεση

Η μεθανιογένεση επιτελείται αποκλειστικά από τα Archaea. Τα μεθανιογόνα Archaea είναι ευρέως εξαπλωμένα και έχουν βρεθεί σε όλα τα περιβάλλοντα που πραγματοποιείται αναερόβια αποικοδόμηση οργανικού υλικού. Μια και δεν μπορούν να αποικοδομήσουν απευθείας πολυμερείς οργανικές ενώσεις, οι οργανισμοί αυτοί βρίσκονται σε δυνητική ή υποχρεωτική συντροφική ένωση με μικροοργανισμικές κοινότητες αναερόβιας αποικοδόμησης (Ferry & Kastead 2007). Η ικανότητα σχηματισμού μεθανίου περιορίζεται σε μία μικρή ομάδα των Archaea που περιλαμβάνει τις φυλογενετικές ομάδες των Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales και Methanopyrales (Ferry & Kastead 2007, Madigan *et al.* 2008).

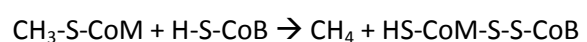
Η μορφολογία των μεθανιογόνων είναι ποικίλη και περιλαμβάνει ραβδόμορφα και σπειροειδή κύτταρα καθώς επίσης κοκκοειδείς

και τύπου σαρκίνα συναθροίσεις (Ferry & Kastead 2007). Τα κοινά χαρακτηριστικά όμως όλων των μεθανιογόνων είναι ότι όλοι ανήκουν στο βασίλειο των Euryarchaeota, είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι και αναπτύσσονται και σχηματίζουν μεθάνιο μόνο σε οξειδοαναγωγικό δυναμικό κάτω των -300mV. Τα υποστρώματα της μεθανιογένεσης μπορεί να είναι H₂/CO₂, οξικό οξύ, φορμικό οξύ, μεθανόλη, μεθυλαμίνες και CO (Zehnder & Brock 1980, Daniels *et al.* 1984).

Ο σχηματισμός μεθανίου από H₂/CO₂ ή οξικό οξύ είναι οι πιο κοινοί μεταβολικοί δρόμοι. Το υδρογόνο και το οξικό οξύ είναι ανταγωνιστικά υποστρώματα στα θαλάσσια ιζήματα καθώς χρησιμοποιούνται επίσης από τα θεικοαναγωγικά Bacteria (Zehnder & Brock 1980), με τους θεικο-αναγωγικούς οργανισμούς να επικρατούν των μεθανιογόνων. Για το λόγο αυτό η μεθανιογένεση κυριαρχεί στις εσωτερικές υδατοσυλλογές και σε χερσαία ανοξικά περιβάλλοντα, όπου η συγκέντρωση των θεικών είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τα θαλάσσια ιζήματα. Τα υπόλοιπα υποστρώματα όπως οι μεθυλαμίνες και η μεθανόλη είναι μη-ανταγωνιστικά, δηλαδή η μεθανιογένεση διενεργείται ανεξάρτητα από την παρουσία της θεικής αναγωγής (Oremland *et al.* 1982). Στα θαλάσσια ιζήματα κάτω από το βάθος που έχουν εξαντληθεί τα θεικά, κυριαρχεί ως διεργασία η μεθανιογένεση:



Η διεργασία της μεθανιογένεσης περιλαμβάνει επτά βήματα που καταλύονται από αρκετά ένζυμα. Το τελευταίο βήμα είναι κοινό για όλα τα υποστρώματα (Thauer 1998):



Το μεθυλοσυνένζυμο M [methyl-coenzyme M, CH₃-S-CoM] είναι ο κεντρικός ενδιάμεσος της οξειδωτικής αντίδρασης και είναι μοναδικό για τους μεθανιογόνους οργανισμούς. Το ένζυμο κλειδί για αυτήν την αντίδραση είναι η αναγωγάση του μεθυλοσυνενζύμου M [methyl-coenzyme M reductase, MCR] (Friedmann *et al.* 1990).

1.2.2 Αερόβια Οξίδωση του Μεθανίου

Όταν το μεθάνιο φτάσει σε οξυγονωμένο τμήμα της βιόσφαιρας οξειδώνεται μέσω της αερόβιας οξείδωσης. Ιδιαίτερα σε υδρόβια συστήματα και εδάφη οι αερόβιοι μεθανιότροφοι ελαχιστοποιούν την έκλυση μεθανίου στην ατμόσφαιρα (Reeburgh 1996, King *et al.* 1998). Από την άλλη μεριά, στα θαλάσσια οικοσυστήματα η πλειονότητα το μεθάνιο έχει ήδη οξειδωθεί αναερόβια, στη ζώνη ιζήματος όπου υπάρχει διείδυση θεικών ιόντων, πριν φτάσει στην οξυγονωμένη ζώνη. Επιπλέον, η διείδυση του οξυγόνου είναι περιορισμένη στα πλούσια σε μεθάνιο θαλάσσια ιζήματα (Wenzhöfer & Glud 2002), επειδή το οξυγόνο εξαντλείται στα πρώτα χιλιοστά λόγω της αποικοδόμησης του οργανικού υλικού. Άρα, τα μικροενδιαιτήματα στα οποία λαμβάνει χώρα η αερόβια οξείδωση του μεθανίου είναι περιορισμένα στα θαλάσσια ιζήματα και μόνο ένα μικρό ποσό του μεθανίου στον ωκεανό καταβυθίζεται λόγω της αερόβιας οξείδωσης του μεθανίου.

Το αρχικό ένζυμο της αερόβιας οξείδωσης του μεθανίου είναι η μονοοξυγενάση του μεθανίου [methane monooxygenase, MMO] (King 1992).

Η δυνατότητα να οξειδώνουν υποστρώματα με ένα άτομο άνθρακα (C₁) είναι μοναδική σε μία ομάδα μικροοργανισμών, τα μεθυλότροφα Bacteria. Μία υποομάδα των μεθυλότροφων, οι μεθανιοοξειδωτικοί

(μεθανιότροφοι) μικροοργανισμοί, έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί το μεθάνιο ως δότη ηλεκτρονίου αλλά και μοναδική πηγή άνθρακα. Τα μεθανιότροφα Bacteria είναι υποχρεωτικά αερόβιοι και απαιτούν την παρουσία μοριακού οξυγόνου για την αρχική οξυγόνωση του χημικά σταθερού μορίου του μεθανίου (Madigan *et al.* 2008). Απαντώνται σε υδάτινα και χερσαία περιβάλλοντα, όπου συνυπάρχουν οξυγόνο και μεθάνιο και υπάρχουν στις ζώνες μετάβασης οξυγονωμένων-ανοξικών συνθηκών (Hanson & Hanson, 1996). Βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στην (οξυγονωμένη) στήλη νερού, στην οξυγονωμένη διάφαση ιζήματος-νερού ή ως συμβιωτικές σε θαλάσσια ασπόνδυλα. Όλοι οι αερόβιοι μεθανιότροφοι παρουσιάζουν την ικανότητα να σχηματίζουν στάδια διάπαυσης όπως κύστες ή ενδοσπόρια που τους επιτρέπει να επιβιώνουν για μεγάλες χρονικές περιόδους ανοξίας ή έλλειψης μεθανίου.

Τα μεθανιότροφα Bacteria κατατάσσονται σε δύο κύριες ομάδες με βάση την κυτταρική δομή, τη φυλογένεση και τα βιοχημικά μονοπάτια αφομοίωσης του άνθρακα. Ο τύπος I μεθανιότροφων έχει δεμάτια από δισκόμορφα κυστίδια στο εσωτερικό του κυττάρου και χρησιμοποιούν την οδό της μονοφωσφορικής ριβουλόζης (RuMP) για την αφομοίωση του άνθρακα (Madigan *et al.* 2008). Με βάση τη φυλογένεση του 16S rRNA γονιδίου, ο τύπος I μεθανιότροφων αντιπροσωπεύεται από την οικογένεια Methylococcaceae των γ-Proteobacteria που περιλαμβάνει τα γένη *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium* και *Methylosphaera* (Garrity *et al.* 2001). Μία υποομάδα του τύπου I των μεθανιότροφων, που χαρακτηρίζεται τύπου X, ανήκει επίσης στα γ-Proteobacteria και περιλαμβάνει τα γένη *Methylococcus* και *Methylocaldum*.

Χρησιμοποιούν τόσο την οδό της μονοφωσφορικής ριβουλόζης όσο και της σερίνης για την αφομοίωση του άνθρακα, αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες και έχουν εμπλουτισμένο G+C περιεχόμενο σε σχέση με τους υπόλοιπους μεθανιότροφους τύπου I (Hanson & Hanson 1996). Αντιθέτως, το μεμβρανικό σύστημα του τύπου II μεθανιότροφων αποτελείται από συζευγμένες μεμβράνες που διατρέχουν την περιφέρεια του κυττάρου. Χρησιμοποιούν το βιοχημικό μονοπάτι της σερίνης για την αφομοίωση του άνθρακα (Madigan *et al.* 2008). Όλοι οι τύπου II μεθανιότροφοι ανήκουν στα α -Proteobacteria και αντιπροσωπεύονται από την οικογένεια Methylocystaceae περιλαμβανομένων των γενών *Methylocystis*, *Methylophila* και *Methylosinus* (Garrity *et al.* 2001).

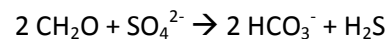
Οι αερόβια μεθανιότροφοι οργανισμοί είναι ευρέως διαδεδομένοι (King 1992, Reeburgh 1996), απαντώνται σε κάθε οξυγονωμένο περιβάλλον που περιέχει μεθάνιο. Έχουν δυνατότητα να μεταβολίζουν μεθάνιο ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (ως 6.3×10^{-3} mM), επιτρέποντάς τους έτσι να εγκαθίστανται στις ζώνες μετάβασης αερόβιων-αναερόβιων συνθηκών. Επίσης έχουν τη δυνατότητα να επιβιώνουν για μεγάλη χρονική περίοδο ανοξίας ή έλλειψης μεθανίου.

Όταν το μεθάνιο διαφεύγει από τα ανοξικά στρώματα των ιζημάτων, οι αερόβιοι μεθανιότροφοι μπορούν να φτάσουν τοπικά υψηλές αφθονίες (Durisch-Kaiser *et al.* 2005) και υψηλούς ρυθμούς ενεργότητας (Valentine *et al.* 2001). Επιπλέον της ανίχνευσης των μικροοργανισμών αυτών μέσω της μεθόδου του επιτόπιου φθορίζοντα υβριδισμού [Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH] με τη χρήση ειδικών μορίων για τους αερόβιους μεθανιότροφους (Eller *et al.* 2001, Gullledge *et*

al. 2001), οι λιπιδιακοί βιοδείκτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι περιβαλλοντικοί μάρτυρες για την παρουσία και αναγνώριση των αερόβιων μεθανιότροφων. Στους τύπους I και X μεθανιότροφων Bacteria τα λιπαρά οξέα με 16 άτομα άνθρακα όπως το 16:1ω8c είναι πιο άφθονα, ενώ στον τύπο II μεθανιότροφων απαντώνται κυρίως λιπαρά οξέα με 18 άτομα άνθρακα όπως το 18:1ω8c (Hanson & Hanson 1996).

1.2.3 Θεϊκή Αναγωγή

Στα θαλάσσια ιζήματα, η θεϊκή αναγωγή είναι από τις σημαντικότερες διεργασίες αποικοδόμησης του οργανικού υλικού (Jørgensen 1982a). Αυτό οφείλεται κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις των θεϊκών ιόντων που μεταφέρονται στο ίζημα από το εισερχόμενο θαλάσσιο νερό (28 mM). Η συγκέντρωση των θεϊκών ιόντων στη διάφαση ιζήματος-νερού είναι περισσότερο από 50 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση άλλων, αποδοτικότερων ενεργειακά, δεκτών ηλεκτρονίων όπως το οξυγόνο, τα νιτρικά ιόντα, ιόντα σίδηρου και μαγγανίου (D'Hondt *et al.* 2002). Η γενική αντίδραση της θεϊκής αναγωγής είναι (Kasten & Jørgensen 2000):



Εκτός από την αποικοδόμηση του οργανικού υλικού, η θεϊκή αναγωγή είναι επίσης το κυρίαρχο μονοπάτι που οδηγεί την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (Boetius *et al.* 2000, Nauhaus *et al.* 2002) και άλλων υδρογονανθράκων (Zengler *et al.* 1999, Joye *et al.* 2004). Τα θειούχα ιόντα που παράγονται από την θεϊκή αναγωγή μπορούν να χρησιμοποιηθούν από θειοοξειδωτικούς, χημειοαυτότροφους προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Τα θεικοαναγωγικά Bacteria διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αναερόβια αποικοδόμηση του οργανικού υλικού και είναι άφθονοι σε ανοξικά, θαλάσσια ιζήματα. Είναι πολυφυλετική ομάδα μικροοργανισμών, οι περισσότεροι όμως περιλαμβάνονται στα δ-Proteobacteria και κατατάσσονται σε 12 γένη. Κάποιοι άλλοι ανήκουν στους αρχέγονους, θερμόφιλους κλάδους του φύλου των Nitrospirae (*Thermodeulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio*), στο φύλο των Firmicutes (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*) και στα Archaea (*Archaeoglobus*, *Caldivirga*). Όλοι οι θεικοαναγωγοί έχουν κοινό χαρακτηριστικό την ικανότητα χρήσης θεικών ιόντων ως τελικό ηλεκτρονιοδέκτη (Rabus *et al.* 2002). Το εύρος των ηλεκτρονιοδοτών που χρησιμοποιούνται από τους θεικοαναγωγούς είναι αρκετά μεγάλο και περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία συστατικών μικρού μοριακού βάρους από ζυμωτική αποικοδόμηση του οργανικού υλικού. Κάποιοι θεικοαναγωγοί οργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν υδρογονάνθρακες, ακόμα και ακατέργαστο πετρέλαιο (Harms *et al.* 1999, Joye *et al.* 2004, Orcutt *et al.* 2005).

Στις ψυχρές αναβλύσεις πολλές ομάδες, «ενδημικές» για αυτό το περιβάλλον, των θεικο-αναγωγικών δ-Proteobacteria έχουν χαρακτηριστεί, όπως SEEP-SRB1 (σχετιζόμενη με τα *Desulfococcus/Desulfosarcina*) ή ομάδα DSS, SEEP-SRB2 (μη σχετιζόμενη), SEEP-SRB3 (σχετιζόμενη με το *Desulfobulbus*) και SEEP-SRB4 (σχετιζόμενη με το *Desulforhopalus*) (Knittel *et al.* 2003). Όλες οι ομάδες φυλογενετικά σχετίζονται στενά με είδη που έχουν καλλιεργηθεί, ωστόσο δεν περιλαμβάνουν κανένα καλλιεργημένο αντιπρόσωπο.

Μεμονωμένα κύτταρα του κλάδου *Desulfococcus/Desulfosarcina* είναι ευρέως διαδεδομένα στα θαλάσσια, ανοξικά

περιβάλλοντα και στις ψυχρές αναβλύσεις και φτάνουν σε μεγάλους αριθμούς *in situ* (Llobet-Brossa *et al.* 1998, Sahm *et al.* 1999, Ravensschlag *et al.* 2000, Knittel *et al.* 2003, Mussmann *et al.* 2005). Η ομάδα SEEP-SRB1 έχει σχετιστεί με τις συντροφίες των ANME-2 (Knittel *et al.* 2003) και έχουν βρεθεί ως σύντροφοι και των ANME-1 (Michaelis *et al.* 2002). Λιπαρά οξέα φτωχά σε ¹³C που πιστεύεται ότι προέρχονται από θεικοαναγωγικά Bacteria που ανήκουν στα SEEP-SRB2, SEEP-SRB3 και SEEP-SRB4 υποδεικνύουν ότι και αυτές οι «ενδημικές» αναβλύσεων ομάδες μετέχουν στη διεργασία της AOM.

1.2.4 Οξίδωση ανηγμένων ενώσεων του θείου

Πολλές ανηγμένες ενώσεις του θείου καθώς και το στοιχειακό θείο μπορούν να αξιοποιηθούν ως ηλεκτρονιοδότες από μεγάλη ποικιλία θειοοξειδωτικών Bacteria. Η οξίδωση των θειούχων ιόντων (ή ισοδύναμα σουλφιδίου) είναι μία διεργασία που απαιτεί τη συνύπαρξη θειούχων ιόντων και οξυγόνου ή νιτρικών ιόντων (Jørgensen 1982b, Fossing *et al.* 1995). Τέτοιου είδους περιβάλλοντα είναι στρωματωμένες μάζες νερού (όπως η Μαύρη Θάλασσα και οι μερομικτικές λίμνες), καθώς και θαλάσσια ή λιμναία ιζήματα όπου η συσσώρευση οργανικού υλικού οδηγεί σε έντονη παραγωγή σουλφιδίου, αλλά και υδροθερμικές πηγές όπου αναβλύζουν πλούσια σε σουλφίδιο ρευστά. Στις ψυχρές αναβλύσεις, η υψηλή βιομάζα των χημειοσυνθετικών βιοκοινοτήτων παρέμενε αίνιγμα για αρκετό καιρό καθώς απουσίαζαν οι γνωστές πηγές θειούχων ιόντων που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν υψηλή ροή αυτού. Σήμερα είναι γνωστό ότι θειούχα ιόντα αποτελούν προϊόν της θεικο-εξαρτώμενης αναερόβιας οξίδωσης του μεθανίου (όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω). Οι μικροοργανισμοί

μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν και άλλες ανηγμένες ενώσεις του θείου, όπως το στοιχειακό θείο ή το θειοθειικό ως ηλεκτρονιοδότη. Το τελικό προϊόν της οξείδωσης είναι τα θειικά ιόντα.

Λίγα είναι γνωστά για την ποικιλότητα και την αφθονία των θειοοξειδωτικών Bacteria [Sulfide Oxidizing Bacteria, SOB] στον ωκεανό. Έχουν μελετηθεί κυρίως, τα γιγάντια (για τα προκαρυωτικά μεγέθη), άχρωμα θειοοξειδωτικά Bacteria που περιλαμβάνουν τις νηματοειδείς μορφές των *Beggiatoa*, *Thiothrix* και *Thioploca* καθώς επίσης και του *Thiomargarita*. Προσέλκυσαν μεγάλη προσοχή στο παρελθόν λόγω του μεγέθους τους και της μεγάλης ποσότητας βιομάζας που δημιουργούν στη διάφαση απουσίας-παρουσίας οξυγόνου. Άλλα θειοοξειδωτικά Bacteria που απαντώνται συχνά σε υδροθερμικά πεδία και αναβλύσεις ανήκουν στο γένος *Arcobacter*. Πυκνοί τάπητες από άχρωμα, νηματοειδή SOB ή τύπου *Arcobacter* δημιουργούν λευκές κηλίδες στο θαλάσσιο πυθμένα και αποτελούν ένδειξη αναγωγικού περιβάλλοντος (Fossing *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 1995, Sahling *et al.* 2002). Η εισροή οργανικού άνθρακα είναι γενικά χαμηλή στα υδροθερμικά πεδία και στις ψυχρές αναβλύσεις και για το λόγο αυτό οι τάπητες SOB είναι σημαντική πηγή τροφής για την πανίδα.

Τα θειοοξειδωτικά Bacteria μπορούν να ανιχνευτούν στο περιβάλλον μέσω των λιπιδιακών βιοδεικτών που φέρουν. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα λιπαρά οξέα όπως το 16:1ω7 και 18:1ω7 είναι διαγνωστικά για τα θειοοξειδωτικά Bacteria σε αναγωγικά θαλάσσια περιβάλλοντα (Jacq *et al.* 1989, McCaffrey *et al.* 1989, Guezennec & Fiala-Medioni 1996, Zhang *et al.* 2005).

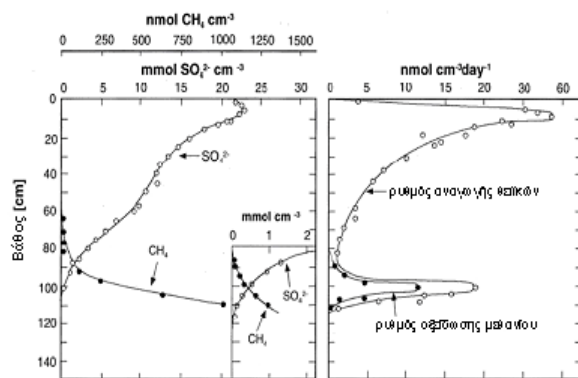
1.2.5 Αναερόβια Οξείδωση του Μεθανίου

Η Αναερόβια Οξείδωση του Μεθανίου είναι η μεγαλύτερη καταβόθρα μεθανίου σε αναγωγικά περιβάλλοντα, όπου το μεθάνιο και τα θειικά ιόντα είναι ταυτόχρονα παρόντα. Η διεργασία της AOM συζευγμένη με τη θειική αναγωγή προτάθηκε, για πρώτη φορά πριν 35 χρόνια, για να εξηγηθούν οι κατανομές μεθανίου και θειικών ιόντων που μετρήθηκαν στο νερό των πόρων ιζήματος πλούσιο σε οργανικό υλικό από ανοξικά περιβάλλοντα (Martens & Berner 1974).

Σήμερα είναι γνωστό ότι το μεθάνιο στα θαλάσσια ιζήματα οξειδώνεται σε αναερόβιες συνθήκες. Η AOM έχει βρεθεί να λαμβάνει χώρα σε διάφορα θαλάσσια ιζήματα και αποτελεί την πρωταρχική διεργασία κατανάλωσης θειικών ιόντων σε περιβάλλοντα που σχετίζονται με το μεθάνιο όπως ιζήματα μεθανιοϋδριτών ή ψυχρές αναβλύσεις (Michaelis *et al.* 2002, Treude *et al.* 2003). Υψηλή ενεργότητα AOM συχνά περιορίζεται σε μια στενή ζώνη του ιζήματος, όπου παρατηρούνται απότομες αλλαγές του μεθανίου και των θειικών ιόντων (Εικόνα 1.9). Υψηλές τιμές ενεργότητας AOM απαντώνται σε θέσεις υψηλής ροής μεθανίου και για το λόγο αυτό οι ψυχρές αναβλύσεις αποτελούν σημεία υψηλής ενεργότητας, «θερμά σημεία» [hot spots] AOM στον ωκεανό.

Η AOM είναι ένα αποδοτικό βιολογικό φίλτρο κατακράτησης του μεθανίου και προστατεύει την ατμόσφαιρα από ένα δραστικό αέριο του θερμοκηπίου (Hinrichs & Boetius 2002 και σχετικές αναφορές). Περισσότερο από το 80% του μεθανίου που παράγεται ετησίως στα ωκεάνια ιζήματα καταναλώνεται μέσω της AOM πριν φτάσει στην ατμόσφαιρα (Reeburgh 1996). Ο μέχρι πρότινος υπολογισμός των 75 Tg/yr μεθανίου που καταναλώνεται μέσω της AOM (χωρίς να εμπερικλείονται στην εκτίμηση

αυτή οι υψηλές τιμές της AOM στις ψυχρές αναβλύσεις) υποδηλώνει ότι η AOM είναι υπεύθυνη για την κατανάλωση σχεδόν των διπλάσιων αποθεμάτων του ατμοσφαιρικού μεθανίου (40 Tg/yr) (Hinrichs & Boetius 2002 και σχετικές αναφορές). Η διεργασία αυτή είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ευαίσθητης ισορροπίας στο ισοζύγιο των αερίων του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα. Επιπλέον, η ατμόσφαιρα της Γης ήταν πλούσια σε μεθάνιο και φτωχή σε οξυγόνο για μία μεγάλη περίοδο και η επέκτασή των γνώσεών μας στο πως η ζωή μπορεί να βασιστεί στο μεθάνιο ως πηγή ενέργειας είναι απαραίτητη για την κατανόηση της εξέλιξης των βιοχημικών κύκλων.



Εικόνα 1.9 Κατακόρυφη κατανομή των συγκεντρώσεων (αριστερά) του μεθανίου και των θειικών ιόντων σε ανοξικά ιζήματα. Σε μεγέθυνση, η ζώνη μετάβασης μεθανίου-θειικών. Μέτρηση μέσω ραδιοσήμανσης (δεξιά) των ρυθμών της AOM και της θειικής αναγωγής (τροποποιημένη από Iversen & Jørgensen 1985)

Τα μεθανότροφα Archaea [Anaerobic Methane Oxidizers, ANME] αναγνωρίστηκαν με μη καλλιεργητικές μεθόδους. Στην αναζήτηση των οργανισμών που εμπλέκονται στην AOM, οι επιστήμονες ανακάλυψαν λιπίδια ειδικά για τους μεθανιογόνους: κροκετάνη, αρχαιόλη και υδροξυαρχαιόλη (Elvert *et al.* 1999, Hinrichs *et al.* 1999, Pancost *et al.* 2001b, Thiel *et al.* 2001) με πολύ ελαφριά ισοτοπική σύσταση άνθρακα.

Αυτά τα προερχόμενα από τα Archaea λιπίδια βρέθηκαν μαζί με ισοτοπικά ελαφριά βακτηριακά λιπίδια.

Σημαντική προσπάθεια στη διερεύνηση της AOM έχει επικεντρωθεί στην αναγνώριση και στη φυλογενετική ταξινόμηση των οργανισμών που εμπλέκονται σε αυτή. Η φυλογενετική ταξινόμηση στηρίζεται στην ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου. Όσον αφορά τα Archaea έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα τρεις κύριες ομάδες: ANME-1, ANME-2 και ANME-3 (Hinrichs *et al.* 1999, Boetius *et al.* 2000, Orphan *et al.* 2001a, Knittel *et al.* 2005, Lösekann *et al.* 2007). Και οι τρεις αυτές ομάδες ανήκουν στα Euryarchaeota, όπου περιλαμβάνονται επίσης και όλοι οι μεθανιογόνοι.

Η ανάλυση γονιδίων και βιοχημικών συστατικών από περιβάλλοντα όπου κυριαρχούν μεθανιοξειδωτικές προκαρυωτικές κοινότητες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η AOM είναι, με βιοχημικούς όρους, αντίστροφη μεθανιογένεση (Hallam *et al.* 2003, Krüger *et al.* 2003, Hallam *et al.* 2004, Meyerdierks *et al.* 2005). Τα γονίδια που βρέθηκαν είναι παρόμοια με αυτά που κωδικοποιούν για τις τρεις υπομονάδες της αναγωγής του μεθυλοσυνενζύμου M, ένζυμο που καταλύει το τελικό στάδιο της μεθανιογένεσης. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες σχετίζονται φυλογενετικά με τις υπομονάδες του αναγωγής του μεθυλοσυνενζύμου M των Methanosarcinales και αποδίδονται τόσο στα ANME-1 όσο και στα ANME-2 Archaea. Επίσης, πρωτεΐνες απομονώθηκαν από ANME-1 μεθανιότροφους τάπητες μικροοργανισμών που διεξάγουν AOM (Krüger *et al.* 2003). Η κυρίαρχη πρωτεΐνη αποτελούνταν από τρεις υπομονάδες με το N-τελικό αμινοξικό άκρο να αντιστοιχεί στα γονίδια που βρέθηκαν. Αυτή η πρωτεΐνη είχε ένα παράγοντα νικελίου που ήταν μία

βαρύτερη μορφή (951 Da) του παράγοντα F₄₃₀ (905 Da), που απαντάται στην αντίστοιχη πρωτεΐνη των μεθανιογόνων μικροοργανισμών. Φαίνεται ότι τα ANME Archaea μπορούν να καταλύουν την αρχική αντίδραση της AOM με ένα ένζυμο το οποίο εξελικτικά έχει κοινή προέλευση με το MCR των μεθανιογόνων, αλλά έχει βελτιστοποιηθεί για «αντίστροφη μεθανιογένεση».

Η AOM έχει προταθεί ότι είναι μία μεταβολική διεργασία που λειτουργεί ως ενζυμικά αντίστροφη μεθανιογένεση συζευγμένη με την αναγωγή θεικών. Πιστεύεται ότι τα μεθανιότροφα Archaea αλληλεπιδρούν με τα θεικοαναγωγικά Bacteria και σχηματίζουν συντροφίες (Hoehler *et al.* 1994, Hinrichs *et al.* 1999, Boetius *et al.* 2000, Valentine & Reeburgh 2000, Orphan *et al.* 2001a) που οξιδώνουν το μεθάνιο με ίσες ποσότητες θεικών ιόντων, παράγοντας διττανθρακικά και θειούχα ιόντα (Nauhaus *et al.* 2002):



Ο όρος συντροφία περιγράφει στενές συναθροίσεις προκαρυωτικών κυττάρων, στις οποίες δύο ή περισσότεροι διαφορετικοί μικροοργανισμοί βρίσκονται σε επαφή (κύτταρο με κύτταρο) και διαμορφώνουν μία σταθερή δομή.

Η απόδοση ελεύθερης ενέργειας είναι πολύ μικρή και πρέπει να μοιράζεται και από τους δύο συντρόφους. Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην AOM αυξάνονται αργά αλλά φτάνουν σε υψηλά ποσά βιομάζας στις ψυχρές αναβλύσεις. Συχνά, αυθιγενείς επίπαγοι ανθρακικού άλατος σχηματίζονται λόγω της αυξημένης τοπικά αλκαλικότητας που προκαλείται από την AOM και την διαθεσιμότητα κατιόντων από το υπερκείμενο θαλάσσιο νερό (Bohrmann *et al.* 1998, Luff & Wallmann 2003). Επίσης, τα θειούχα ιόντα,

προϊόν της AOM χρησιμοποιούνται από χημειοσυνθετικές κοινότητες που βασίζονται στο θείο, όπως μικροβιακούς τάπητες άχρωμων, θειοοξιδωτικών Bacteria και ασπονδύλων που φέρουν θειοοξιδωτικούς συμβιώτες (MacDonald *et al.* 1989, Sahling *et al.* 2002, Sibuet & Olu-Le Roy 2002).

Η ακριβής μεταβολική διεργασία της AOM είναι ακόμη άγνωστη και όλες οι αντιδράσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία παραμένουν υποθετικές όσο οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην AOM δεν έχουν απομονωθεί και δεν μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν για λεπτομερή ανάλυση της φυσιολογίας τους, των μεταβολικών οδών που χρησιμοποιούν και των εμπλεκόμενων ενζύμων. Πρόσφατη πρόοδος έχει γίνει στη δημιουργία εμπλουτισμένων καλλιέργειών αυτών των οργανισμών (Nauhaus *et al.* 2002, Girguis *et al.* 2003). Οι Nauhaus *et al.* (2002) παρουσίασαν τη διενέργεια AOM υπό εργαστηριακές συνθήκες και έδειξαν ότι AOM και θεική αναγωγή είναι συζευγμένες με αναλογία 1:1, όπως προβλέπεται και από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης. Οι ρυθμοί και των δύο διεργασιών αυξήθηκαν με την αύξηση της μερικής πίεσης του μεθανίου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η AOM εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του διαλυμένου μεθανίου.

Σε πολλές συντροφικές σχέσεις το υδρογόνο μεταφέρεται ως ενδιάμεσο μόριο μεταξύ των συντρόφων και η «διαειδική μεταφορά υδρογόνου» έχει προταθεί ότι λαμβάνει χώρα στις συντροφίες που διενεργείται AOM. Ωστόσο, παραγωγή υδρογόνου δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα σε μεθανιογόνους μικροοργανισμούς ακόμα και σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης υδρογόνου (Valentine & Reeburgh 2000, Knittel & Boetius 2009). Επίσης, θερμοδυναμικά δεν είναι πιθανό το υδρογόνο να λειτουργεί ως

ενδιάμεσο μόριο επειδή θα χάνονταν υψηλά ποσά ενέργειας λόγω της διάχυσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Sørensen *et al.* 2001). Το ίδιο ισχύει για το οξικό και τη μεθανόλη (Sørensen *et al.* 2001). Το φορμικό οξύ φαίνεται να είναι κατάλληλο ενδιάμεσο μόριο αλλά δεν έδειξε καμία επίδραση στην AOM (Nauhaus *et al.* 2002). Τα ηλεκτρόνια μπορούν επίσης να χρησιμεύουν ως ενδιάμεσα που διακινούνται από μόρια ηλεκτρονιο-μεταφορείς [electron-shuttling].

Ο επιτόπιος φθορίζων υβριδισμός αποκάλυψε για πρώτη φορά οπτικά το συνεταιρισμό των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην AOM. Οι Boetius *et al.* (2000), παρουσίασαν τις πρώτες μικροσκοπικές εικόνες μίας συντροφίας AOM, οπτικοποιημένες μέσω FISH, που δείχνουν συναθροίσεις κυττάρων Archaea που περικλείονται από ένα κέλυφος θεικοαναγωγικών Bacteria.

Μετά την αποκάλυψη της ιδιόμορφης μορφολογίας του συνεταιρισμού εκπροσώπων των Archaea και Bacteria της AOM και άλλες μέθοδοι εφαρμόστηκαν για να αποδειχθεί άμεσα η μεθανιοτροφία του. Ο συνδυασμός της FISH με τη φασματομετρία μάζας δευτερογενούς ιόντος [secondary ion mass spectrometry, SIMS] επέτρεψε τη μέτρηση των κατανομών του $\delta^{13}\text{C}$ της βιομάζας των συναθροίσεων (Orphan *et al.* 2001b). Βρέθηκε υψηλή μείωση σε ^{13}C των κυττάρων των Archaea με τιμές -96% και -62% για τα κύτταρα των Bacteria, αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν την αφομοίωση του ισοτοπικά ελαφριού μεθανίου από Archaea και Bacteria.

Τα ANME-1 Archaea σχετίζονται με τις τάξεις των Methanomicrobiales και Methanosarcinales και έχουν βρεθεί να συνδέονται με τα θεικοαναγωγικά Bacteria του κλάδου *Desulfosarcina-Desulfococcus* (DSS) σε μικροοργανισμικούς τάπητες (Michaelis *et al.*

2002, Knittel *et al.* 2005). Αυτοί οι μεθανιότροφοι τάπητες σχηματίζουν μικροβιακούς υφάλους και έχουν βρεθεί σε αναβλύσεις μεθανίου στη Μαύρη Θάλασσα. Τα ANME-1 είναι μία από τις κυριότερες ομάδες που συμμετέχουν στους τάπητες και αποτελούν το 10-45% της συνολικής μικροοργανισμικής βιομάζας. Επίσης, ANME-1 συχνά βρίσκονται στα βαθύτερα στρώματα ιζημάτων ψυχρών αναβλύσεων, όπου απαντώνται ως συναθροίσεις κυττάρων (Orphan *et al.* 2002, Orcutt *et al.* 2005) αλλά και ως μεμονωμένα κύτταρα (Orphan *et al.* 2001a, Knittel *et al.* 2005, Orcutt *et al.* 2005). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι μεμονωμένα ANME-1 κύτταρα χωρίς στενή επαφή με θεικοαναγωγικά Bacteria έχουν ανιχνευτεί. Μέχρι στιγμής, δεν έχει αποσαφηνιστεί αν τα μεμονωμένα ANME-1 αλληλεπιδρούν με θεικοαναγωγικά Bacteria που διαβιούν ελεύθερα ή αν είναι ικανά να οξειδώνουν το μεθάνιο χωρίς σύντροφο Bacteria. Το θεικοαναγωγικό Αρχαίο *Archaeoglobus fulgidus* φέρει όλα τα απαραίτητα για μεθανιογένεση γονίδια (Klenk *et al.* 1997), επομένως είναι πιθανό ένας οργανισμός να συνδυάζει τις μεταβολικές ικανότητες της οξείδωσης του μεθανίου και της θεικής αναγωγής.

Τα ANME-2 Archaea είναι φυλογενετικά πιο στενά συνδεδεμένα με τα Methanosarcinales από ANME-1 και σχηματίζουν συντροφίες με τα θεικοαναγωγικά Bacteria DSS (ANME-2/DSS). Αυτού του είδους οι συντροφίες ανακαλύφθηκαν αρχικά σε επιφανειακά ιζήματα υπερκείμενα μεθανιοϋδριτών του Hydrate Ridge (Boetius *et al.* 2000) και αποτελούν το 90% της μικροοργανισμικής βιομάζας ($1,4 \times 10^{10}$ κύτταρα/ml). Είναι οι πρώτες που οπτικοποιήθηκαν με φθορίζοντα υβριδισμό.

Μία τέτοια συντροφία μέσου μεγέθους αποτελείται από ένα πυρήνα 100 κυττάρων ANME Archaea που περιβάλλεται από ένα κέλυφος περίπου 200 κυττάρων SBR Bacteria. Οι συναθροίσεις αυξάνονται μέχρι μεγέθους 6-10μm, πριν χωριστούν σε υποσυναθροίσεις, φανερώνοντας την ανάγκη να κρατηθούν μικρές οι αποστάσεις μεταξύ των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανταλλαγής των υποστρωμάτων.

Πρόσφατες έρευνες σε ίζημα από το Haakon Mosby MV αποκάλυψαν ότι κυριαρχεί μια τρίτη ομάδα των ANME που δεν είχε χαρακτηριστεί νωρίτερα (Lösekann *et al.* 2007). Αυτή η νέα ομάδα ονομάστηκε ANME-3 και φυλογενετικά σχετίζεται στενά με είδη των Methanococcoïdes. Τα ANME-3 διαμορφώνουν συντροφίες δομής κελύφους και έχουν συσχετιστεί με θειικοαναγωγικά Bacteria του κλάδου *Desulfobulbus* (DBB).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΛΙΠΙΔΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

2.1 ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΑ ΛΙΠΙΔΙΑ

Τα μεμβρανικά λιπίδια [glycerol-based membrane lipids] αποτελούν συνήθως το 2-6% του ξηρού βάρους ενός προκαρυωτικού κυττάρου (Langworthy 1982, Langworthy & Pond 1986, Ferrante *et al.* 1990) και αυτό αποτελούν πολύτιμους βιοδείκτες στις περιβαλλοντικές επιστήμες που μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες για την προκαρυωτική σύσταση παλαιότερων και σύγχρονων οικοσυστημάτων (Brocks *et al.* 1999, Hinrichs *et al.* 1999, Kuypers *et al.* 2001).

2.1.1 Τα λιπίδια στη μελέτη των βιοκοινοτήτων

Η δομή των μεμβρανικών λιπιδίων είναι ένα χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τα Archaea από τα Bacteria και τους Ευκαρυώτες και για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός της είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων και στη διερεύνηση των κυρίαρχων βιογεωχημικών διεργασιών που τις διαμορφώνουν (Boschker *et al.* 1998, Boschker & Middelburg 2002, Madigan *et al.* 2008). Γενικά, οι μεμβράνες των Bacteria αποτελούνται από λιπαρά οξέα που προσδέονται μέσω εστερικού δεσμού *sn*-γλυκερόλ-3-φωσφορικό (G3P) σκελετό. Τα λιπαρά οξέα μπορεί να περιέχουν διπλούς δεσμούς, μεθυλικές διακλαδώσεις ή δομές δακτυλίων τριών ατόμων άνθρακα.

Οι μεμβράνες των Archaea, από την άλλη μεριά, αποτελούνται από ισοπρενοειδείς αλκοόλες, που συνδέονται μέσω αιθερικού δεσμού με *sn*-γλυκερόλ-1-φωσφορικό (G1P) σκελετό (De Rosa *et al.* 1986, De Rosa & Gambacorta 1988, Boucher 2007). Εκτός από τους διαιθέρες τα Archaea μπορούν επίσης να περιέχουν γλυκερο τετρααιθέρες που

σχηματίζουν μονή στιβάδα αντί για διπλή (De Rosa & Gambacorta 1988, Koga *et al.* 1993a). Η παρουσία συγκεκριμένων συστατικών των λιπιδίων καθώς και η σχετική τους αφθονία αποτελούν ενδείξεις για συγκεκριμένες ομάδες των Archaea ή Bacteria.

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο εργαλείο στη μελέτη των μικροοργανισμών και μια πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την περιγραφή της σύστασης των κοινοτήτων και την κατανόηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών (Guezennec & Fiala-Medioni 1996, Guezennec *et al.* 1996, Fang *et al.* 2000, Summit 2000, Rütters *et al.* 2002). Ωστόσο σε περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο και άλλοι χαρακτηριστικοί βιοδείκτες εξετάζονται για τη μελέτη των βιοκοινοτήτων.

Στη μελέτη των προκαρυωτικών βιοκοινοτήτων οι λιπιδιακοί βιοδείκτες δίνουν πληροφορίες μέχρι το επίπεδο του βασιλείου [kingdom] και σε κάποιες περιπτώσεις της τάξης [order] ενώ οι φυλογενετικές τεχνικές ανάλυσης μέσω του 16S RNA γονιδίου είναι πιο ειδικές. Όμως η ισοτοπική σύσταση σε άνθρακα [C] ενός βιοδείκτη είναι χαρακτηριστική της πηγής του άνθρακα και/ή του μεταβολικού δρόμου που χρησιμοποιείται από τον παραγωγό του και αυτή η ιδιότητα δεν μπορεί μέχρι στιγμής να εφαρμοστεί στο γενετικό υλικό που προέρχεται από ένα περιβαλλοντικό δείγμα.

Η ανάλυση των λιπιδιακών βιοδεικτών σε δείγματα ιζημάτων από περιβάλλοντα ενεργά σε αναερόβια οξείδωση του μεθανίου έδωσαν το 1994 τις πρώτες ενδείξεις ότι οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί μπορούν να

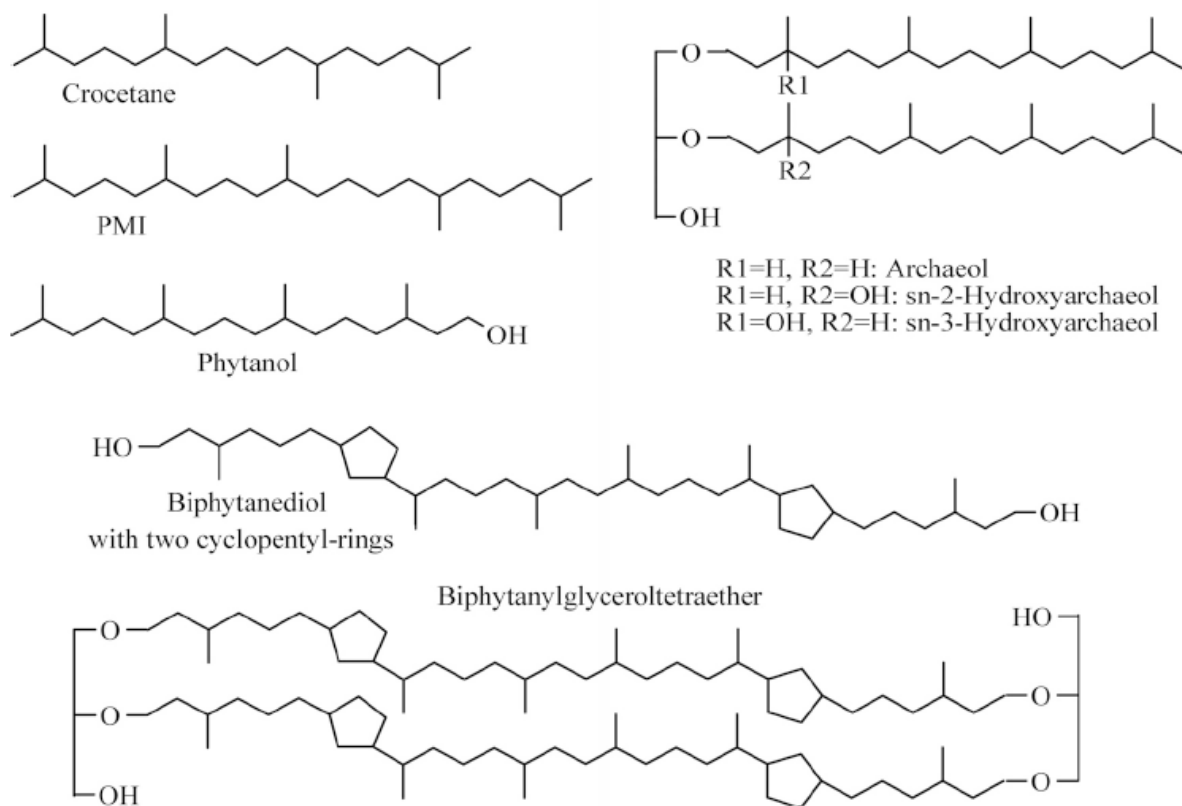
αφομοιώσουν άνθρακα προερχόμενο από το μεθάνιο (Bian 1994, Bian *et al.* 2001). Οι λιπιδικοί βιοδείκτες των μεθανιότροφων Archaea παρουσιάζουν τιμές του ισότοπου $\delta^{13}\text{C}$ της τάξης του -100% και χαμηλότερες, που είναι ενδεικτικές της σχεδόν αποκλειστικής χρήσης του μεθανίου ως πηγή άνθρακα για τη βιοσύνθεσή τους (Hinrichs *et al.* 1999, Bian *et al.* 2001).

2.1.2 Βιοδείκτες των Archaea

Το πρώτο βιοσυνθετικό προϊόν αναερόβιων μικροοργανισμών με τη χρήση του μεθανίου ως πηγή άνθρακα που ανιχνεύθηκε είναι η κροκετάνη [crocetane] (Bian 1994, Bian *et al.* 2001), ένας C_{20} ισοπρενοειδής υδατάνθρακας (2,6,11,15-τετραμεθυλοδεκαεξάνη) (Εικόνα 2.1) και προέλευσης από τα Αρχαία. Αν και η κροκετάνη είναι η μοναδική

χημική ένωση προερχόμενη από τα Archaea που έχει σχετιστεί αποκλειστικά με την AOM, δεν έχουν απομονωθεί ακόμα οι βιολογικοί παραγωγοί της. Έχουν ανιχνευθεί επίσης, σε περιβάλλοντα που διενεργείται AOM, αρκετά μη κορεσμένα ανάλογα, ελαφριά σε ^{13}C της κροκετάνης (Elvert *et al.* 2000, Pancost *et al.* 2000).

Η πρώτη αδιαμφισβήτητη απόδειξη για την εμπλοκή των αντιπροσώπων της Επικράτειας των Archaea στην AOM προήλθε από την ανίχνευση ελαφριών σε ^{13}C ενώσεων ειδικών για Αρχαία από περιβάλλοντα ψυχρών αναβλύσεων πλούσιων σε μεθάνιο (Hinrichs *et al.* 1999). Σε αυτή την εργασία οι ενώσεις αρχαιόλη [archaeol] και *sn*-2-υδροξυαρχαιόλη [*sn*-2-hydroxyarchaeol] (Εικόνα 2.1) με τιμές $\delta^{13}\text{C}$ της τάξης του -100% και χαμηλότερες επιβεβαίωσαν την εμπλοκή των



Εικόνα 2.1 Οι κυριότεροι λιπιδικοί βιοδείκτες των Archaea που έχουν βρεθεί σε περιβάλλοντα που διενεργείται AOM. Έχουν βρεθεί επίσης και μη-κορεσμένα ανάλογα της κροκετάνης και των PMI (από Hinrichs & Boetius 2002)

Archaea στην AOM. Με βάση τη χημειοταξινομική [chemotaxonomy] οργανισμών που έχουν καλλιεργηθεί, η *sn*-2-υδροξυαρχαιόλη υπέδειξε την εμπλοκή μελών των Methanosarcinales, κάποια στελέχη των οποίων συνθέτουν υδροξυαρχαιόλη σε μεγάλες ποσότητες (Koga *et al.* 1998). Επίσης και η *sn*-3-υδροξυαρχαιόλη έχει σχετιστεί με την AOM, καθώς και η εκτεταμένη μορφή υδροξυαρχαιόλης (Stadnitskaia *et al.* 2008). Η *sn*-2- και η *sn*-3-υδροξυαρχαιόλη έχουν ανιχνευθεί σε μικρή ποσότητα και σε κάποια μέλη της τάξης των Methanococcales.

Άλλες ενώσεις που έχουν προέλευση από τα Archaea και απαντώνται συχνά σε περιβάλλοντα που διεξάγεται AOM είναι η 2,6,10,15,19-πενταμεθυλικοσάνη [2,6,10,15,19-pentamethyleicosane, PMI] και τα ακόρεστα ανάλογά της [PMIΔ], η φυτανόλη [phytanol], οι διφυτανεδιόλες [biphytanediols] και διφυτανυλτετρααιθέρες [biphytanyl tetraethers] τόσο με κυκλικά όσο και με άκυκλα ισοπρενοειδή τμήματα (Εικόνα 2.1).

Η κατανομή και η σχετική αφθονία των χαρακτηριστικών λιπιδίων των Archaea αντανακλούν την ποικιλότητα και την πιθανή διαφοροποίηση των βιοκοινοτήτων της AOM από θέση σε θέση. Αρκετές έρευνες δείχνουν ότι η κροκετάνη και η αρχαιόλη/υδροξυαρχαιόλη έχουν διαφορετικούς βιολογικούς παραγωγούς (Hinrichs & Boetius 2002 και αναφορές).

2.1.3 Βιοδείκτες των Bacteria

Στις περισσότερες έρευνες για τον προσδιορισμό των λιπιδίων που σχετίζονται με τις βιοκοινότητες της AOM οι χαρακτηριστικοί βιοδείκτες που προέρχονται από τα Archaea με μειωμένο ^{13}C συνυπάρχουν με ενώσεις που έχουν επίσης χαμηλή τιμή ^{13}C και πιθανολογούμενη προέλευση από τα Bacteria.

Οι προερχόμενες από τα Bacteria ενώσεις είναι συνήθως ελαφρά εμπλουτισμένες σε ^{13}C , σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ενώσεις των Archaea, με τυπικές τιμές $\delta^{13}\text{C}$ μεταξύ -100 και -50% ανάλογα με την ένωση και το περιβάλλον. Όπως και με τα προϊόντα των Archaea, αυτό το εύρος τιμών αποδεικνύει ενσωμάτωση απεμπλουτισμένου άνθρακα, μερικά ως ολικά προερχόμενο από το μεθάνιο (Hinrichs *et al.* 2000b, Orphan *et al.* 2001a, Michaelis *et al.* 2002, Elvert *et al.* 2003, Blumenberg *et al.* 2004).

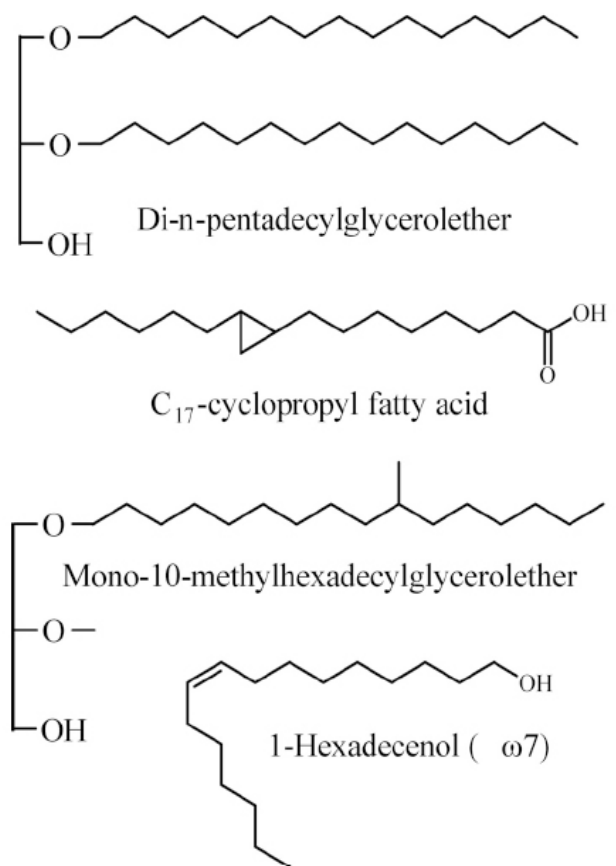
Τα λιπαρά οξέα που σχετίζονται με την AOM (Εικόνα 2.2) επιδεικνύουν τυπικά χαρακτηριστικά λιπαρών οξέων που προέρχονται από θειικο-αναγωγικά Bacteria, όπως σχετικά υψηλές ποσότητες διακλαδισμένων [methyl-branched] και κυκλοπροπυλο-ισομερών [cyclopropyl isomers] και θέσεις διπλών δεσμών τυπικές για λιπαρά οξέα από θειικοαναγωγικούς οργανισμούς, όπως είναι το δεκαεξενικό-11 οξύ, $\text{C}_{16:1\omega 5\text{c}}$ ⁶. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του $\text{C}_{16:1\omega 5\text{c}}$ σε ιζήματα που διενεργείται AOM συζευγμένη με θειική αναγωγή, στο Hydrate Ridge, προκάλεσε την έκπληξη των ερευνητών καθώς ήταν γνωστό ότι το αναερόβιο βιοσυνθετικό μονοπάτι των

⁶ Η σημειογραφία των λιπαρών οξέων αναπαριστά τον αριθμό των ατόμων του C που υπάρχουν στην ένωση ακολουθούμενο από άνω και κάτω τελεία και τον αριθμό των διπλών δεσμών που υπάρχουν στο μόριο. Η θέση του διπλού δεσμού σε σχέση με την αλειφατική άκρη του μορίου γράφεται μετά το σύμβολο ωμέγα, ενώ ακολουθεί το σύμβολο "c" (cis) και "t" (trans). Οι προθέσεις "i" (iso) και "ai" (anteiso) αναπαριστούν τη θέση διακλάδωσης ενός ή δύο ατόμων άνθρακα αντίστοιχα από το αλειφατικό άκρο. Διακλαδώσεις σε άλλες θέσεις σημειώνεται με τον αριθμό της διακλάδωσης από το αλειφατικό άκρο ως πρόθεση. Τα κυκλοπροπανικά λιπαρά οξέα σημειώνονται με το πρόθεμα "cy"

λιπαρών οξέων των Bacteria ευνοεί τη σύνθεση των ω7 ισομερών (Elvert *et al.* 2003). Οι χαμηλές τιμές σε ^{13}C αυτής της ένωσης υπέδειξε βακτηριακή πηγή που σχετίζεται την AOM και πιστεύεται ότι πρόκειται για κάποιο θεικοαναγωγικό βακτήριο της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus* (Elvert *et al.* 2003). Αντίστοιχες παρατηρήσεις (Elvert *et al.* 2003, Elvert *et al.* 2005, Niemann & Elvert 2008) έχουν κατατάξει και το 11,12-μεθυλενδεκαεξανικό οξύ [11,12 methylene hexadecanoic acid], cyC17:0ω5,6, στους χαρακτηριστικούς βιοδείκτες για τα Bacteria που επιτελούν θεική αναγωγή σε συντροφία με Archaea. Σε άλλα θέσεις διενέργειας AOM, όπως ο Κόλπος του Μεξικού και η Μαύρη Θάλασσα διαφορετικοί βακτηριακοί βιοδείκτες επικρατούν, όπως τα iC15 και aiC15 (Thiel *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2002) υποδηλώνοντας πως διαφορετικοί βακτηριακοί σύντροφοι μπορεί να συμμετέχουν στην AOM. Βιοδείκτες για τα θεικοαναγωγικά Bacteria έχουν επίσης χαρακτηριστεί τα λιπαρά οξέα C18:1ω7c, C17:1ω7c, C17:1ω6 (Taylor & Parkes 1983, Taylor & Parkes 1985, Hinrichs *et al.* 2000b, Elvert *et al.* 2003, Elvert *et al.* 2005). Η παρουσία του 10MeC16 έχει σχετιστεί επίσης με την παρουσία θεικοαναγωγικών Bacteria (Taylor & Parkes 1983, Kuever *et al.* 2001) και κυρίως της οικογένειας Desulfobacteriaceae (Matsui *et al.* 2004).

Επίσης Bacteria που εμπλέκονται στις υπόλοιπες διεργασίες που σχετίζονται με την AOM (βλέπε κεφάλαιο 2), όπως Bacteria που διενεργούν Αερόβια Οξείδωση του Μεθανίου μπορούν να ανιχνευθούν μέσω των βιοδεικτών που παράγουν. Βιοδείκτες, όπως το C16:1ω6 και το C16:1ω8 έχουν βρεθεί σε μεθανιότροφους τύπου I και X, ενώ το C18:1ω6 και το C18:1ω8 κυριαρχούν σε μεθανιότροφους τύπου II (Makula 1978, Urakami & Komagata 1984,

Hanson & Hanson 1996). Εκτός από τα λιπαρά οξέα και άλλες κατηγορίες βιοδεικτών θεωρούνται χαρακτηριστικοί των μεθανιότροφων Bacteria όπως οι 4-μεθυλοστερόλες (Jahnke *et al.* 1992, Jahnke *et al.* 1995, Schouten *et al.* 2000, Elvert & Niemann 2008) και σπανοειδών⁷ ενώσεων (Werne *et al.* 2002).



Εικόνα 2.2 Οι κυριότεροι λιπιδιακοί βιοδείκτες των Bacteria που έχουν βρεθεί σε περιβάλλοντα που διενεργείται AOM (από Hinrichs & Boetius 2002)

Οι τάπητες μικροοργανισμών που σχηματίζονται σε περιβάλλοντα πλούσια σε H₂S έχουν υψηλές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων C16:1ω7c και C18:1ω7c (Guezennec & Fiala-

⁷ η μετάφραση του όρου από την αγγλική γλώσσα έγινε με βάση ηχομμητικά κριτήρια

Medioni 1996, Guezennec *et al.* 1998, Li *et al.* 2007), καθώς και αυτών σε συνδυασμό με την παρουσία των C16:0 και C18:0 (Jacq *et al.* 1989).

Τα ευρήματα αυτά, τα οποία συνδυάστηκαν και με τη μορφολογική και φυλογενετική αναγνώριση των μικροοργανισμών που εμπλέκονται, σχετίζουν την παρουσία των C16:1ω7c, C18:1ω7c, C16:0 και C18:0 έχει βρεθεί επίσης σε και έχουν αποδοθεί στους θειοοξειδωτικούς μικροοργανισμούς και αποτελούν βιοδείκτες θειοτροφίας (Guezennec & Fiala-Medioni 1996, Guezennec *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2005, Li *et al.* 2007).

Εκτός από τα λιπαρά οξέα και άλλες ενώσεις έχουν προταθεί από τους ερευνητές ως χαρακτηριστικοί βιοδείκτες βακτηριακής συντροφίας (κυρίως μέσω συζευγμένης θειικής αναγωγής) της AOM λόγω της χαμηλής σύστασής τους σε ¹³C σε ιζήματα όπου διενεργείται οξείδωση του μεθανίου. Πρόκειται για αλκοόλες (Elvert *et al.* 2000), μη-ισοπρενοειδείς μονοαιθέρες (Hinrichs *et al.* 2000b) [monoalkylglycerolethers, MAGEs] και μη-ισοπρενοειδείς δι-αλκυλογλυκεροαιθέρες (Hinrichs *et al.* 2000b, Pancost *et al.* 2001a, Werne *et al.* 2002) [dialkylglycerolethers, DAGEs] που παρουσιάζουν ισχυρή δομική ομοιότητα (π.χ. ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα, ίδια θέση διπλών δεσμών και μεθυλικής υποκατάστασης) με τα χαρακτηριστικά λιπαρά οξέα που προαναφέρθηκαν.

Λίγα είναι γνωστά για τους βιολογικούς παραγωγούς των μόνο- και δι-αλκυλογλυκεροαιθέρων [MAGEs και DAGEs, αντίστοιχα] και των αλκοολών με παρόμοιες δομές. Αυτές οι δομές είναι πολύ διαφορετικές από το αίθερο λιπίδια που παράγονται από τα Archaea. Τα Archaea συνθέτουν αποκλειστικά ισοπρενοειδή αιθερικά λιπίδια ενώ αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούν κ-αλκυλό και μεθυλ-αλκυλό υποκαταστάτες [*n*-alkyl and methyl-

alkyl substituents]. Τα MAGEs λιπίδια έχουν βρεθεί σε καλλιέργειες των Bacteria *Desulfosarcina variabilis* και *Desulforhabdus amnigenus* (Rütters *et al.* 2001). Ενώ, οι μοναδικοί παραγωγοί, που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα, των DAGEs λιπιδίων είναι Bacteria που ανήκουν σε φυλογενετικά πολύ απομακρυσμένα αυτότροφα φύλα όπως τα *Aquifex spp.* και *Thermodesulfotobacterium commune* (Langworthy *et al.* 1983, Huber *et al.* 1992 και σχετικές αναφορές). Ωστόσο αυτά τα λιπίδια δεν έχουν ακόμα απομονωθεί από κανένα μεσόφιλο ή ψυχρόφιλο θεικαναγωγικό μικροοργανισμό. Οι οργανισμοί στους οποίους έχουν βρεθεί αυτές οι ενώσεις είναι θερμοφιλοι και αλόφιλοι υπάρχουν μόνο σε υδροθερμικά ενεργά περιβάλλοντα. Σε ιζήματα ιλύος όπου κυριαρχούν αυτά τα αιθερολιπίδια, δεν έχουν βρεθεί οι γνωστοί βακτηριακοί παραγωγοί στις 16S rRNA βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν από τα ιζήματα (Orphan *et al.* 2002, Teske *et al.* 2002). Ωστόσο, αυτός ο χημειοταξινομικός σύνδεσμος υποδεικνύει ότι ψυχρόφιλα ή μεσόφιλα Bacteria της μεθανιότροφης βιοκοινότητας έχουν τους κοντινότερους συγγενείς τους μεταξύ θερμοφίλων μικροοργανισμών υδροθερμικών συστημάτων (Hinrichs & Boetius 2002).

Η ισοτοπική σύσταση του άνθρακα των λιπιδίων που σχετίζονται με τα διαφορετικά μέλη των βιοκοινοτήτων της AOM είναι σε συμφωνία με τη μέχρι στιγμής ισχύουσα υπόθεση που αφορά την «τροφική δομή». Γενικά, μέγιστη μείωση του ¹³C παρατηρείται στα λιπίδια που προέρχονται από μεθανιότροφα Archaea, ακολουθούμενη από μικρότερες μειώσεις στα μη-ισοπρενοειδή αίθερο λιπίδια (Hinrichs *et al.* 2000b). Αυτή η «ισοτοπική στρωμάτωση» είναι γενική αλλά δεν μπορεί να αποτελέσει απόδειξη της υπόθεσης

που υποστηρίζει ότι η αρχική οξείδωση του μεθανίου επιτελείται από μεθανιότροφα Archaea και τα προϊόντα της οξείδωσης (ανόργανος άνθρακας και H₂ ή οργανικές C1 και C2 ενώσεις) μεταφέρονται στη συνέχεια στο στενά συνδεδεμένο βακτηριακό σύντροφο. Αυτός ο σύντροφος χρησιμοποιεί κυρίως τον άνθρακα που του παρέχεται από τα Archaea, όπως φαίνεται από την ισχυρή ελάττωση σε ¹³C των αιθερό λιπιδίων. Υποθέτοντας ότι οι παραγωγοί αιθερό λιπιδίων είναι αυτότροφοι, ο μηχανισμός αυτός απαιτεί σχηματισμό μικροπεριβάλλοντος με ισχυρή φυσικοχημική διαβάθμιση, έτσι ώστε η διάχυση από το CO₂ του νερού των πόρων του ιζήματος στο κέντρο της αντίδρασης να είναι πολύ μικρότερη από τη χρήση του CO₂ από την οξείδωση του μεθανίου (Hinrichs & Boetius 2002).

2.1.4 Χρωματογραφία αερίων

Ο συνδυασμός της χρωματογραφίας αερίων με τριχοειδή στήλη και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) ή φασματογράφου μάζας (GC-MS), αποτελεί ένα σύστημα που χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού κατηγοριών οργανικών ενώσεων. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των ενώσεων έγινε με τις δομικές πληροφορίες που παρήχθησαν από φάσματα μάζας των ενώσεων με το σύστημα χρωματογραφίας αερίων-φασματογραφίας μάζας (GC-MS) και σύγκριση των χρόνων συγκράτησης –εξόδου [retention time, RT] στην τριχοειδή στήλη στα συστήματα GC-FID και GC-MS.

Στην τεχνική GC-MS αφού γίνει έκλυση των μορίων από την τριχοειδή στήλη, αυτά οδηγούνται στο θάλαμο ιονισμού, όπου ιονίζονται και μέσω κρούσης με δέσμη ηλεκτρονίων, θραυσματοποιούνται. Η δεσμίδα των ιόντων εξέρχεται από το θάλαμο ιονισμού

και διαχωρίζεται μέσω τετραπολικού φίλτρου ανάλογα με το λόγο μάζας προς τον αριθμό φορτίο του ιόντος, (m/z). Ένας ανιχνευτής 'παγιδεύει' τα ιόντα και ένα σύστημα καταγραφής απεικονίζει το φάσμα μάζας μιας ένωσης. Το φάσμα μάζας περιέχει συνήθως το μοριακό ιόν (M⁺) της ένωσης καθώς και μια σειρά από ιόντα που παράγονται από διαδοχικές διασπάσεις. Για τη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε η μέθοδος Πλήρους Σάρωσης [Full Scan] της φασματοσκοπίας μάζας ηλεκτρικού ιονισμού, όπου λαμβάνονται πληροφορίες για όλα τα θραύσματα των ενώσεων που εκλύονται από το χρωματογράφο αερίων.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Δειγματοληψία

Δείγματα ιλύος που έφεραν μεθανιοϋδρίτες συλλέχθηκαν από τα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος Amsterdam (θέση AN05BC05, 35° 20' 02'' N, 30° 16' 18'' E, 2030m) και Kazan (θέση AN07BC01, 35° 25' 55'' N, 30° 33' 42'' E 1700m), που βρίσκονται στα Όρη του Αναξιμανδρου στην Ανατολική Μεσόγειο με το Ω/Κ Αιγαίο, το Μάιο του 2003. Κυλινδρικοί πυρηνολήπτες «ώσης» [rush corers] εφαρμόστηκαν για τη λήψη ιζήματος που είχε συλλεχθεί μέσω κυβωτιοπυρηνολήπτη τύπου Eckmann (0.16m²).

Συνοπτικά, έγινε ανάκτηση του κυβωτιοπυρηνολήπτη στο κατάστρωμα όπου και παρατηρήθηκαν σημάδια της εξαχνωσης των μεθανιοϋδριτών στο βαθύτερο μισό του ιζήματος. Με τη βοήθεια κυλινδρικών πυρηνοληπτών συλλέχθηκαν πυρήνες για διαφορετικούς τύπους αναλύσεων: οπτική περιγραφή και γεωλογική ανάλυση, γεωχημική καταγραφή της κατακόρυφης κατανομής CH₄ και SO₄²⁻, ανάλυση λιπιδιακών βιοδεικτών και φυλογενετική ανάλυση.

Οι πυρήνες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση του οργανικού υλικού και την ανάλυση των λιπιδιακών βιοδεικτών, που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο, αποθηκεύθηκαν αμέσως στους -20°C και σε όλη τη διάρκεια της ωκεανογραφικής αποστολής. Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους. Πριν την εκχύλιση του οργανικού υλικού οι πυρήνες αποψύχθηκαν στους 4°C και ακολούθησε οριζόντια κατάτμηση αυτών ανά 5 cm από την επιφάνεια ως τα 30 cm.

2.2.2 Μέτρηση μεθανίου, θειούχων και θειικών ιόντων

Οι μετρήσεις του μεθανίου του ιζήματος, καθώς και των θειικών, θειούχων ιόντων πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Dr. DeLange και περιγράφεται στην εργασία των Kormas *et al.* (2008). Συνοπτικά, για τη μέτρηση του μεθανίου, 3ml ιζήματος πάρθηκε αμέσως μετά την ανάκτηση του πυρήνα στο κατάστρωμα. Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος σε γυάλινο δοχείο των 30ml που είχε πληρωθεί με κορεσμένο διάλυμα NaCl (300 g/l) και η σφράγιση του φιαλιδίου με ελαστικό πώμα, ώστε να αποτραπεί η παραμονή αερίου σε αυτό. Ακολούθησε εισαγωγή με σύριγγα 5 ml αερίου N_2 με ταυτόχρονη απομάκρυνση 5 ml κορεσμένου διαλύματος NaCl με δεύτερη σύριγγα.

Τα φιαλίδια αναδεύτηκαν για να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενό τους και αφέθηκαν ανάποδα σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h πριν την ανάλυση. Η συγκέντρωση του μεθανίου μετρήθηκε εν πλω, με ένεση 1 ml αερίου δείγματος σε αέριο χρωματογράφο Shimadzu GC-14B και στήλη Porapak Q (6 ft, 2 mm i.d., 80/100 mesh; Alltech, Deerfield, IL, USA) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν ρυθμισμένη

στους 30°C . Πρότυπες συγκεντρώσεις 15, 100 και 1000 ppm μίγματος ουσιών $\text{C}_1\text{--C}_6$, 1000 ppm μεθανίου and 1% μεθανίου μετρήθηκαν πριν την ανάλυση των δειγμάτων. Η τυπική απόκλιση των μετρήσεων ήταν $\sim 3\%$. Η αναγωγή της συγκέντρωσης στην υγρή φάση έγινε μέσω του συντελεστή διαλυτότητας Bunsen β (Wiesenburg & Guinasso 1979, Forselius *et al.* 1999).

Λόγω του υψηλού βαθμού υπερκορεσμού σε διαλυμένα αέρια των περισσότερων ιζημάτων ένα σημαντικό αλλά απροσδιόριστο ποσό αερίου πιθανό να έχει διαφύγει κατά τη διάρκεια της ανάκτησης του πυρήνα και των υπόλοιπων διεργασιών της πυρηνοληψίας. Οι συγκεντρώσεις επομένως που μετρήθηκαν αντιπροσωπεύουν τις ελάχιστες τιμές αυτών που υπάρχουν στην πραγματικότητα. Όλες οι συγκεντρώσεις αναπροσαρμόστηκαν με βάση την αλατότητα και τη θερμοκρασία και εκφράστηκαν ως mmol/kg νωπού ιζήματος.

Για την ανάλυση των θειικών χρησιμοποιήθηκε το νερό των πόρων ιζήματος. Ίζημα 10-25 ml φυγοκεντρήθηκε και το νερό των πόρων ιζήματος διηθήθηκε μέσω φίλτρου οξικής κυτταρίνης 0,2 μm . Το διήθημα χωρίστηκε σε υποδείγματα μέσα σε κλωβό αναερόβιας ατμόσφαιρας. Για τον προσδιορισμό του H_2S , σε 2 ml υποδείγματος προστέθηκαν 10ml 0,1 N NaOH. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε εν πλω σε αναλυτή συνεχούς ροής TRAAC8800, με την εφαρμογή της Μεθόδου Κολομετρίας (Wiesenburg & Guinasso 1979, Forselius *et al.* 1999). Οι συγκεντρώσεις των θειικών ιόντων μετρήθηκαν στο εργαστήριο ως S, χρησιμοποιώντας Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής Επαγωγικού Πλάσματος [inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry]. Η

τυπική απόκλιση των μετρήσεων είναι της τάξης του 3% ή μικρότερη.

2.2.3 Εκχύλιση ολικού οργανικού υλικού

Οι οργανικές ουσίες εκχυλίστηκαν από τα δείγματα ιζήματος που συλλέχθηκαν έγινε χρησιμοποιώντας τροποποιημένη μεθόδου των Bligh&Dryer (White & Ringelberg 1998) με τη χρήση μικροκυμάτων.

Αρχικά τα ιζήματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφίλησης [freeze drier] για 24 ώρες ώστε να επιτευχθεί απομάκρυνση του νερού σε χαμηλή θερμοκρασία (-50°C). Ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων με λειοτρίβιση των κόκκων του ιζήματος σε γουδί, ζύγιση 17-20 g ομογενοποιημένου ιζήματος και προσθήκη εσωτερικών πρότυπων ουσιών [Internal standard, IS].

Ακολούθησε η εκχύλιση του οργανικού υλικού, όπως περιγράφεται από Rossel *et al.* (2008), με μίγμα μεθανόλης/διχλωρομεθανίου/φωσφορικού διαλύματος (2:1:0.8 v/v) στους 70°C σε σύστημα μικροκυμάτων MARS-X, CEM. Μετά από φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε χοάνη διαχωρισμού. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλη μία φορά. Η εκχύλιση συνεχίστηκε με μίγμα μεθανόλης/διχλωρομεθανίου/διαλύματος τριχλωροοξικού οξέος (2:1:0.8 v/v), τη χρήση μικροκυμάτων στους 70°C, φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκείμενου στη χοάνη διαχωρισμού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με αυτό το μίγμα διαλυτών για μία ακόμα φορά.

Ακολούθησε προσθήκη διχλωρομεθανίου στη χοάνη διαχωρισμού για το σχηματισμό δύο φάσεων, και ανάδευση της χοάνης για περίπου 20 min με σύντομα διαλείμματα ηρεμίας (30 sec) κάθε 5 min και συλλογή της οργανικής φάσης. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε για δύο φορές ακόμα και μετά την τελευταία επανάληψη, η υδατική φάση

απορρίφθηκε. Η χοάνη διαχωρισμού καθαρίστηκε και μεταφέρθηκε ξανά σε αυτή το οργανικό εκχύλισμα. Ακολούθησε προσθήκη νερού, ανάδευση της χοάνης όπως και στο προηγούμενο στάδιο, συλλογή της οργανικής φάσης και απόρριψη της υδατικής, τρεις φορές. Το οργανικό εκχύλισμα συλλέγεται σε φιάλη τύπου Turbo Var και συμπυκνώνεται υπό συνεχή ροή αζώτου.

Από το ολικό οργανικό εκχύλισμα απομακρύνθηκαν οι ασφαλίτες με την προσθήκη κ-εξανίου και απορρίπτοντας το μη-διαλυτό μέρος. Τα φωσφολιπίδια διαχωρίστηκαν από τα υπόλοιπα λιπίδια και ακολούθησε μεθεστεροποίηση αυτών σε μεθυλεστέρες, όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους Elvert *et al.* (2003) ενώ στα υπόλοιπα λιπίδια εφαρμόστηκε διαχωρισμός κλασμάτων αυξάνουσας πολικότητας με τη χρήση στήλης Supelco LC-NH₂® και τη διαδοχική έκλυση της στήλης με διαλύτες. Για το κλάσμα των υδρογονανθράκων χρησιμοποιήθηκαν 4ml κ-εξανίου, για το κλάσμα των κετόνων-εστέρων 6ml ν-εξανίου-διχλωρομεθανίου 3:1 και για το κλάσμα των αλκοολών 7ml διχλωρομεθανίου-ακετόνης 9:1.

Οι αλκοόλες, όπως και τα λιπαρά οξέα, μετατράπηκαν πριν το ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους, στα αντίστοιχα τριμεθυλοσιλοπαράγωγα, λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας και ευκολίας στην ανάλυσή τους στην αέρια χρωματογραφία. Η αντίδραση σιλανισμού, έγινε με τη προσθήκη 100 μl N,O-bis-trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) σε pyridine, στο αντίστοιχο κλάσμα έκλυσης της υγρής χρωματογραφίας στήλης για το οποίο είχε προηγηθεί η απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών. Το μίγμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε κατόπιν σε φούρνο για 1 ώρα στους 90 °C. Ακολούθησε συμπύκνωση υπό ροή αζώτου, μέχρι ξηρού.

2.2.4 Χρωματογραφία Αερίων

Τα τέσσερα κλάσματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία αερίων συζευγμένη με φασματομετρία μάζας. Χρησιμοποιήθηκε 30m πολική HP τριχοειδή στήλη πυριτίου (εσωτερικής διαμέτρου 0,32mm) με επικάλυψη διασταυρούμενης φάσης μεθυλοσιλικόνης (πάχος υμενίου 0,25μm, Hewlett Packard) σε αναλυτή Thermo-Finnigan Trace GC Finnigan Trace MS⁺. Η ενέργεια ιονισμού ήταν στα 70eV και το πεδίο τιμών μάζας 40-900 m/z (με 1,5 σαρώσεις/second). Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 350V, η θερμοκρασία διάφασης ήταν 300°C και το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο-φορέας (συνεχής ροή 1,4 ml/min). Η εισαγωγή των δειγμάτων στο χρωματογράφο έγινε με αυτόματο δειγματολήπτη στους 310 °C, ενώ το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 60°C, για 1min, σταδιακή αύξηση στους 150°C με ρυθμό 10°C/min, αύξηση μέχρι τους 310°C με ρυθμό 4°C/min και διατήρηση της θερμοκρασίας αυτής για 25min. Κατά το συνδυασμό της χρωματογραφίας μάζας με τον ανιχνευτή φλόγας ιονισμού εφαρμόστηκε το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Η καταγραφή των δεδομένων έγινε σε ολοκληρωτή Finnigan Trace, ενώ για την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur 2.0. Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα αερίων του κλάσματος των αλκοολών και των λιπαρών οξέων παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.1, στο Σχήμα 2.2 και στο Σχήμα 2.3.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

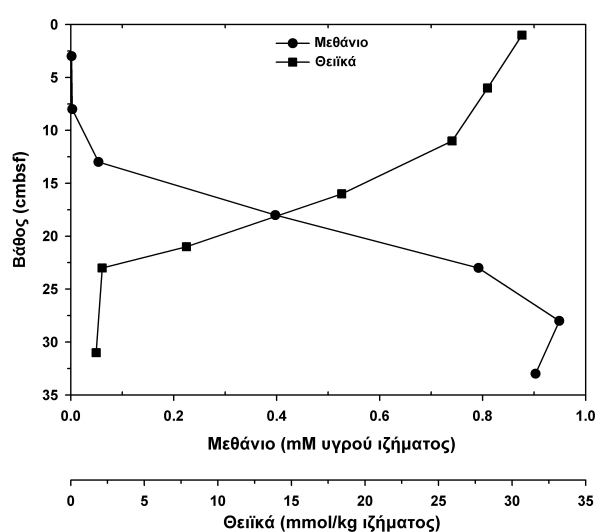
Αναλύθηκαν, χρωματογραφικά, όλα τα κλάσματα που προέκυψαν. Για τις ανάγκες της εργασίας αυτής ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες για τη μελέτη

των ηφαιστειών ιλύος, Amsterdam και Kazan, εστιάστηκε στα κλάσματα των αλκοολών και των λιπαρών οξέων, κυρίως επειδή οι συγκεντρώσεις των χαρακτηριστικών υδρογονανθράκων, κροκετάνης και PMIs ήταν πολύ μικρές σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων βιοδεικτών.

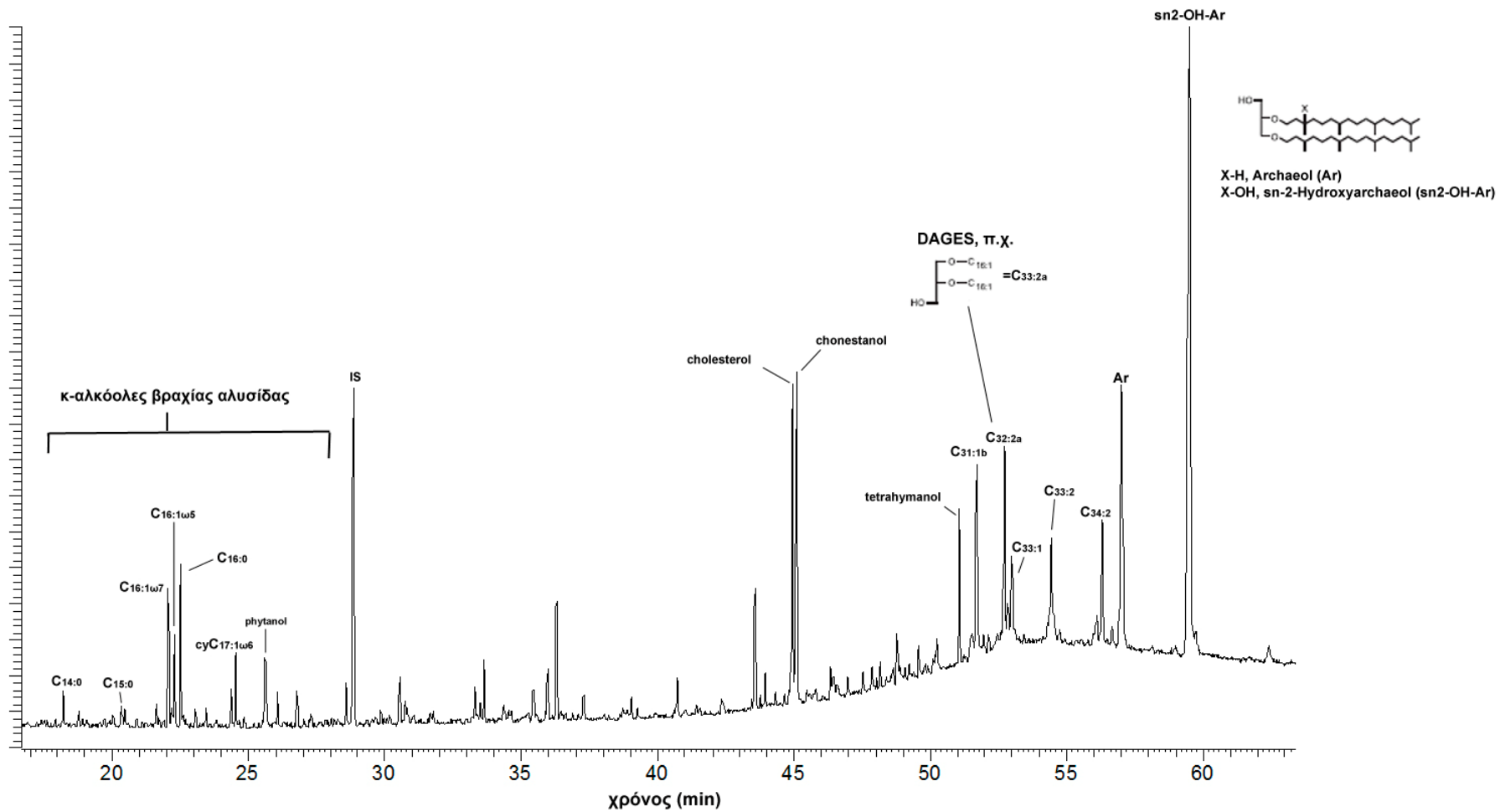
Τα ιζήματα και των δύο ηφαιστειών που μελετήθηκαν είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε «Μίγμα μη Διαχωριζόμενων Ουσιών» [Unresolved Complex Material, UCM] και για το λόγο κρίθηκε απαραίτητος ο καθαρισμός και συλλογή των διαλυτών σε κ-εξάνιο οργανικών ουσιών πριν το διαχωρισμό σε κλάσματα αυξανόμενης πολικότητας.

2.3.1 Amsterdam MV

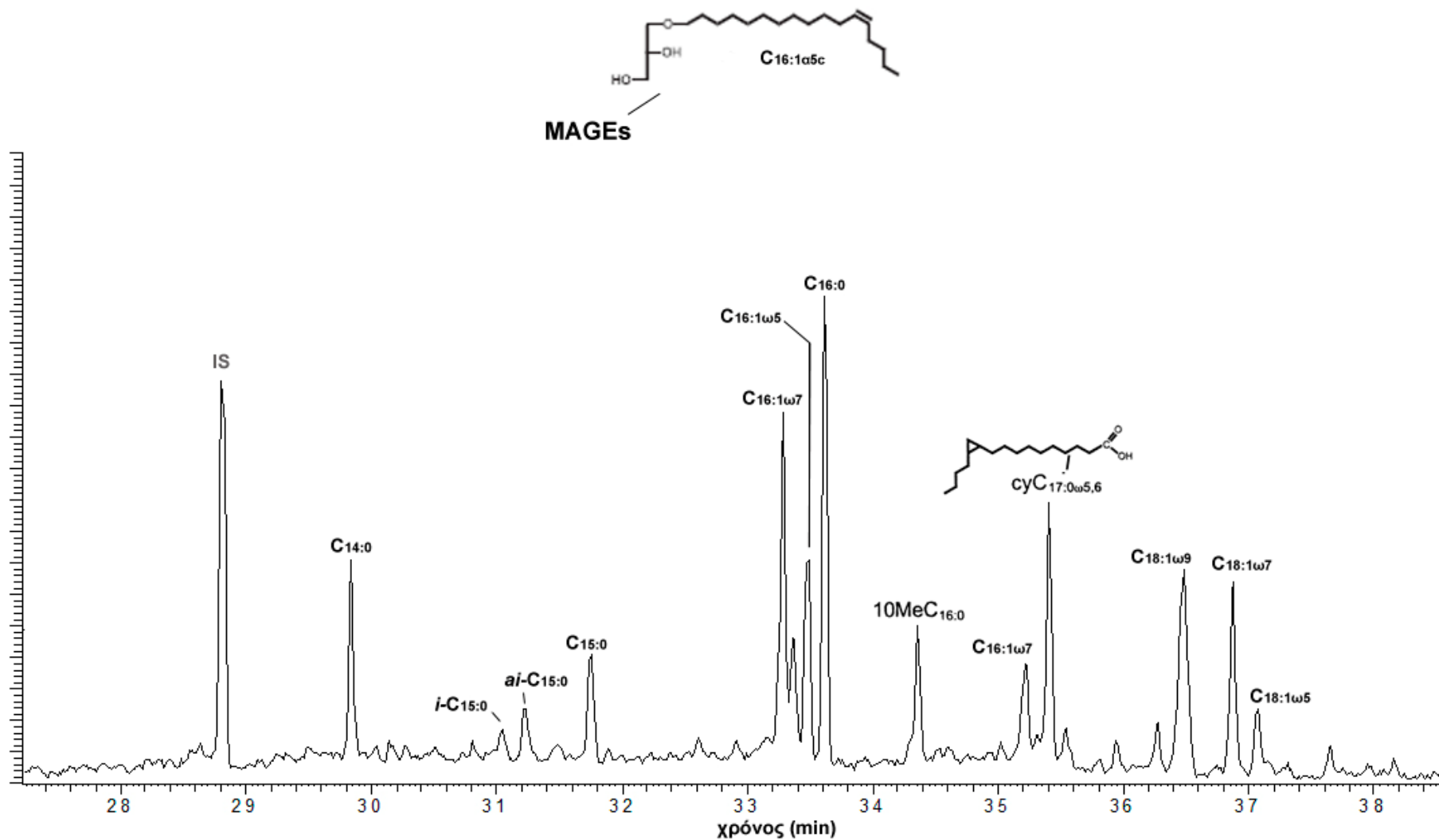
Η κατακόρυφη κατανομή στις συγκεντρώσεις των θειικών ιόντων φαίνεται ότι παρουσιάζει σταδιακή μείωση από την επιφάνεια όπου έχει τιμή πάνω από τα 30 mmol l⁻¹ νωπού ιζήματος μέχρι τα 22 cmbsf όπου φτάνει στην τιμή 2 mmol l⁻¹ περίπου ενώ μειώνεται ακόμα περισσότερο στα βαθύτερα στρώματα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4.



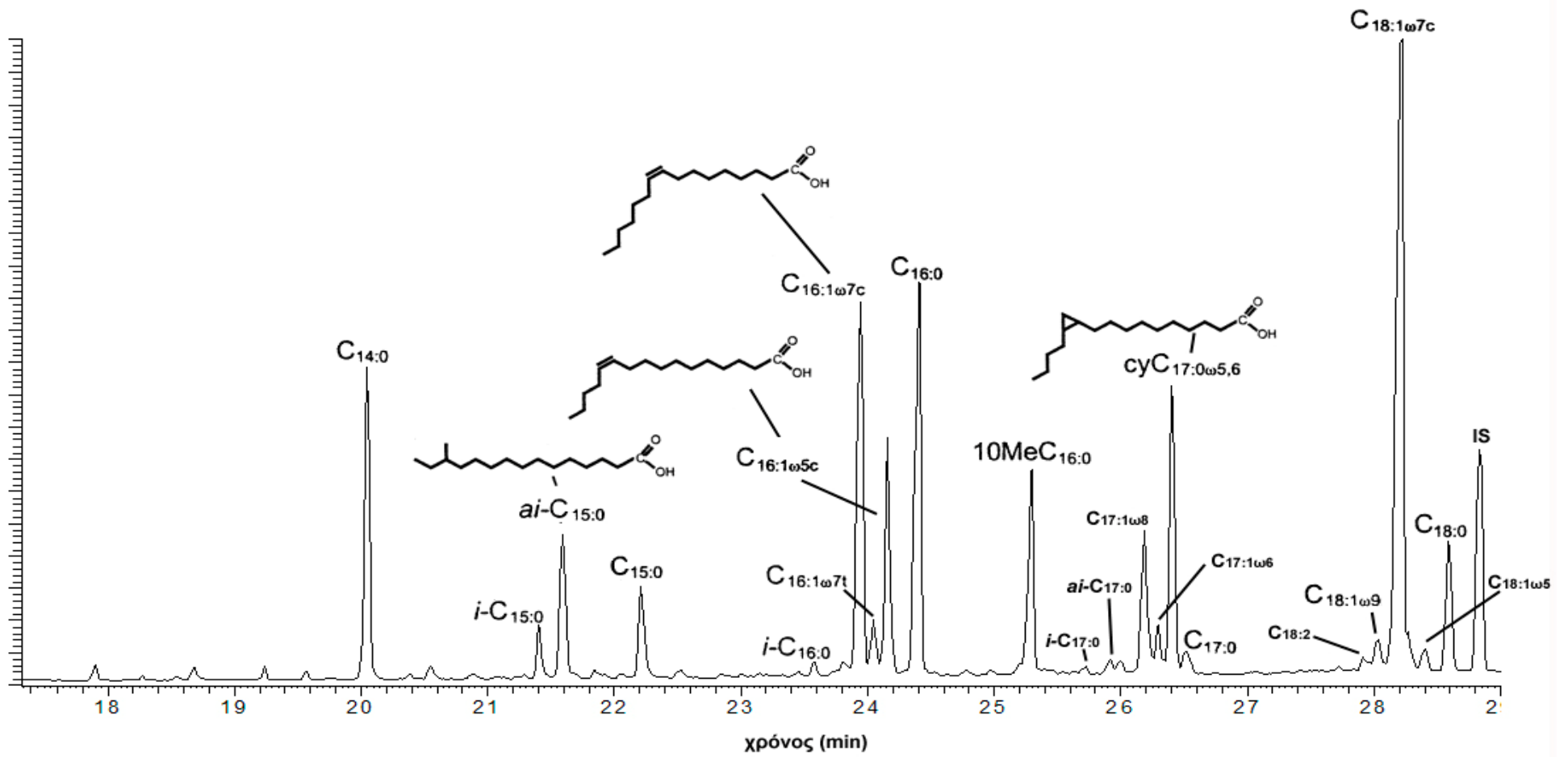
Σχήμα 2.4 Κατακόρυφη κατανομή του μεθανίου [methane] και θειικών ιόντων [sulfate] στη θέση AN05BC05 του Amsterdam MV



Σχήμα 3.1 Τμήμα χαρακτηριστικού χρωματογραφήματος αερίων του κλάσματος των αλκοολών



Σχήμα 3.2 Τμήμα χρωματογραφήματος αερίων του κλάσματος των αλκοολών. Παρουσιάζεται το χρονικό «παράθυρο» έκλυσης των μονοαλκυλγλυκερολαιθέρων (MAGes)



Σχήμα 3.3 Τμήμα χαρακτηριστικού χρωματογραφήματος αερίων του κλάσματος των λιπαρών οξέων

Οι συγκεντρώσεις του μεθανίου είναι πρακτικά μηδενικές στα πρώτα εκατοστά του ιζήματος αλλά φάνηκαν να αυξάνονται σημαντικά από τα 8 cmbsf ως 28 cmbsf, όπου εμφανίστηκε η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης μεθανίου.

2.3.1.1 Ανάλυση του κλάσματος των αλκοολών

Τα δείγματα ιζήματος από το Amsterdam MV παρουσίασαν υψηλές τιμές βιοδεικτών. Ένα τυπικό χρωματογράφημα του κλάσματος των αλκοολών παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1 και στο Σχήμα 2.2. Σε όλους τους οριζόντες του Amsterdam MV, που εξετάστηκαν, κυρίαρχη ήταν η παρουσία της *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης (Πίνακας 2.1). Η κατακόρυφη κατανομή της συγκέντρωσης της *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης που μετρήθηκε ξεκινάει από τιμή 3,433 $\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρού βάρους ιζήματος [dry weight, dw] στον οριζοντα ιζήματος 0-5 cmbsf αυξάνεται μέχρι τον οριζοντα 15-20 cmbsf, όπου η συγκέντρωσή της φτάνει τα 7,986 $\mu\text{g g}^{-1}$ και μειώνεται στους βαθύτερους οριζόντες, με χαμηλότερη τιμή στα 25-30 cmbsf (2,800 $\mu\text{g g}^{-1}$). Υψηλές συγκεντρώσεις μετρήθηκαν και για την αρχαιόλη, που παρουσίασε παρόμοιο κατακόρυφο πρότυπο κατανομής των τιμών της με μέγιστη 2,868 $\mu\text{g g}^{-1}$ στον οριζοντα 15-20 cmbsf. Οι συγκεντρώσεις της *sn*-3-υδροξυαρχαιόλης κυμάνθηκαν από 0,022 $\mu\text{g g}^{-1}$ (στην επιφάνεια) μέχρι 0,304 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 15-20 cmbsf. Ανιχνεύθηκαν, επίσης, οι μορφές της εκτεταμένης υδροξυαρχαιόλης με μέγιστη συγκέντρωση 0,364 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 10-15 cmbsf και της δι-υδροξυαρχαιόλης με υψηλές τιμές στα 15-20 cmbsf (0,821 $\mu\text{g g}^{-1}$) και στα 25-30 cmbsf (0,871 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Όσον αφορά άλλους βιοδείκτες που ανιχνεύθηκαν στο ίδιο κλάσμα, οι σημαντικότεροι για το περιβάλλον που

μελετήθηκε και οι πιο άφθονοι από αυτούς παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Οι MAGEs που βρέθηκαν φαίνεται να παρουσιάζουν τη μέγιστη συγκέντρωσή τους στον οριζοντα ιζήματος 5-10 cmbsf ενώ η άλλη κατηγορία αλκυλυκερολοιθέρων, οι DAGE παρουσιάζουν τη μέγιστη τιμή των συγκεντρώσεών τους στα 10-15 και 15-20 cmbsf.

Επίσης, ανιχνεύθηκαν οι αλκοόλες με την αντίστοιχη δομή (αριθμό ατόμων άνθρακα, θέσεις διακλαδώσεων ή διπλών δεσμών) και φαίνεται ότι ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο κατακόρυφης κατανομής συγκεντρώσεων στο ιζήμα με τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα. Ωστόσο επειδή οι τιμές τους είναι αρκετά μικρότερες δεν παρουσιάζονται αναλυτικά.

Υψηλές συγκεντρώσεις παρουσίασαν οι στερεοειδείς αλκοόλες (στερόλες και στανόλες) για το τμήμα του ιζήματος από την επιφάνεια ως τα 20 cmbsf. Η υψηλότερη τιμή συγκέντρωσης 2,592 $\mu\text{g g}^{-1}$ παρατηρήθηκε για την 5α(H)-Χολεσταν-3β-όλης (χολεστανόλη) στον οριζοντα των 5-10 cmbsf. Σημαντική είναι και η παρουσία της 4α-μεθυλοχολεστ-8(14)-εν-3β-όλη (4-μεθυλοστερόλη) με μέγιστη τιμή 0.851 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 10-15 cmbsf.

2.3.1.2 Ανάλυση του κλάσματος των λιπαρών οξέων

Ένα τυπικό χρωματογράφημα του κλάσματος των λιπαρών οξέων που προέκυψε από αυτή την μελέτη παρατίθεται στο Σχήμα 2.3 και αναλυτική παρουσίαση των τιμών των κυριότερων λιπαρών οξέων που ταυτοποιήθηκαν γίνεται στον Πίνακα 2.2. Στους δύο ρηχότερους οριζόντες, 0-5 και 5-10 cmbsf, την υψηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζει το C16:1ω7c (1,800 και 2,425 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα) ενώ το επόμενο πιο άφθονο φαίνεται να είναι το C18:1ω7c (1,340 και 1,880 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα). Το

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρού βάρους ιζήματος) των σημαντικότερων βιοδεικτών του κλάσματος των αλκοολών στο Amsterdam MV

	Βάθος (cmbsf)					
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
MAGE C14	0,173	0,272	0,168	0,195	0,263	0,149
MAGE iC15	0,052	0,054	0,033	0,034	0,045	0,062
MAGE aiC15	0,080	0,089	0,034	0,049	0,071	0,127
MAGE C15	0,113	0,173	0,086	0,068	0,149	0,105
MAGE C16:1 ω 7	0,322	0,424	0,319	0,174	0,170	0,088
MAGE C16:1 ω 5	0,180	0,300	0,162	0,134	0,109	0,092
MAGE C16	0,154	0,613	0,321	0,303	0,392	0,288
MAGE 10MeC16:0	0,115	0,182	0,169	0,015	0,000	0,000
MAGE C17:1 ω 8	0,131	0,175	0,140	0,077	0,055	0,006
MAGE cyC17:0 ω 5,6	0,236	0,332	0,190	0,237	0,291	0,058
MAGE C18:1 ω 5	0,177	0,267	0,144	0,078	0,068	0,050
MAGE C18:1 ω 7	0,051	0,110	0,063	0,013	0,022	0,060
cholesterol	1,001	1,131	0,390	0,662	0,132	0,375
cholestanol	2,225	2,592	1,584	1,339	0,429	0,640
4Methylsterol	0,402	0,399	0,851	0,581	0,196	0,112
Tetrahymanol	0,236	0,289	0,598	0,544	0,191	0,101
DAGE C30:0	0,074	0,145	0,310	0,196	0,000	0,000
DAGE C31:1b	0,178	0,193	0,347	0,656	0,277	0,084
DAGE C32:2a	0,082	0,083	0,223	0,000	0,000	0,000
DAGE C32:0	0,075	0,085	1,986	0,213	0,049	0,010
DAGE C32:1	0,048	0,032	0,074	2,285	0,079	0,000
DAGE C33:2	0,155	0,123	0,219	0,381	0,164	0,008
DAGE C33:0	0,122	0,078	0,142	0,286	0,148	0,080
DAGE C34:2	0,251	0,193	0,507	0,821	0,256	0,022
DAGE C34:0	0,040	0,000	0,000	0,296	0,240	0,000
archaeol	0,969	1,021	2,207	2,868	0,655	1,286
sn-2-hydroxyarchaeol	3,433	3,510	5,098	7,986	2,837	2,800
sn-3-hydroxyarchaeol	0,022	0,223	0,170	0,304	0,149	0,226
di-OH-archaeol	0,148	0,340	0,293	0,821	0,364	0,871
ext.OH-archaeol	0,262	0,184	0,364	0,104	0,017	0,000
OH-arch/arch	3,54	3,44	2,31	2,78	4,33	2,18

Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρού βάρους ιζήματος) των σημαντικότερων βιοδεικτών του κλάσματος των λιπαρών οξέων στο Amsterdam MV

	Βάθος (cmbsf)					
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
C14	0,344	1,059	0,697	0,308	0,238	0,105
iC15	0,227	0,175	0,121	0,074	0,044	0,021
aiC15	0,316	0,332	0,327	0,190	0,151	0,073
C15	0,118	0,202	0,189	0,207	0,117	0,052
iC16	0,037	0,071	0,037	0,042	0,022	0,000
C16:1 ω 7c	1,800	2,425	0,906	0,505	0,339	0,037
C16:1 ω 7t	0,193	0,144	0,103	0,074	0,050	0,000
C16:1 ω 5c	0,614	0,439	0,509	0,474	0,265	0,036
C16	1,316	1,287	0,997	0,927	0,512	0,388
10MeC16	0,387	0,865	0,526	0,044	0,035	0,000
iC17	0,052	0,036	0,020	0,000	0,000	0,013
aiC17	0,078	0,066	0,044	0,000	0,000	0,023
C17:1 ω 8	0,100	0,156	0,404	0,212	0,161	0,015
C17:1 ω 6	0,011	0,070	0,138	0,074	0,057	0,000
cyC17:0 ω 5,6	0,129	0,235	0,702	0,910	0,934	0,121
C17	0,075	0,074	0,062	0,066	0,047	0,030
C18:2	0,000	0,291	0,033	0,050	0,042	0,025
C18:1 ω 9	0,208	0,185	0,080	0,147	0,059	0,073
C18:1 ω 7c	1,340	1,880	1,813	1,000	0,646	0,051
C18:1 ω 7t	0,083	0,125	0,064	0,068	0,025	0,000
C18:1 ω 5	0,034	0,000	0,031	0,074	0,058	0,000
C18	0,588	0,419	0,337	0,373	0,339	0,240
$\alpha\beta$ -C32 hopanoic acid	0,089	0,113	0,079	0,029	0,095	0,126
$\beta\beta$ -C32 hopanoic acid	0,220	0,206	0,162	0,057	0,177	0,162
<hr/>						
aiC15/ iC15	1,39	1,90	2,69	2,56	3,47	3,48
C16:1 ω 5c/ iC15	2,71	2,50	4,19	6,37	6,09	1,72
C16:1 ω 7t/C16:1 ω 7c	0,11	0,06	0,11	0,15	0,15	
C18:1 ω 7t/C18:1 ω 7c	0,06	0,07	0,04	0,07	0,04	

κορεσμένο λιπαρό οξύ C16:0 για τους δύο αυτούς ορίζοντες εμφανίστηκε σε παρόμοια συγκέντρωση $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ περίπου.

Στον ορίζοντα των 10-15 cmbsf, το C18:1 ω 7c ($1,813 \mu\text{g g}^{-1}$) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ μειώνονται οι συγκεντρώσεις των C16:1 ω 7c ($0,906 \mu\text{g g}^{-1}$) και C16:0 ($0,997 \mu\text{g g}^{-1}$). Σημαντική συνεισφορά σε αυτόν τον ορίζοντα βρέθηκε να έχει το

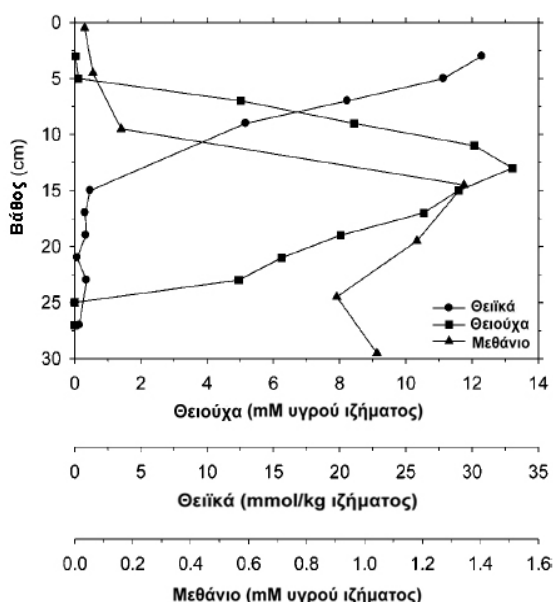
cyC17:0 ω 5,6 ($0,702 \mu\text{g g}^{-1}$). Υψηλή συγκέντρωση έχει αυτό το ασυνήθιστο λιπαρό οξύ και στους ορίζοντες 15-20 και 20-25 cmbsf (με τιμή αντίστοιχα $0,910$ και $0,934 \mu\text{g g}^{-1}$). Στους ορίζοντες αυτούς μειώνονται τα C16:0 ($0,927$ και $0,512 \mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα) και C18:1 ω 7c ($1,000$ και $0,646 \mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα).

Στο βαθύτερο ορίζοντα που μελετήθηκε, τα περισσότερα λιπαρά οξέα

παρουσιάστηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και μία τάξη μεγέθους) σε σχέση με τους προηγούμενους ορίζοντες. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει το C16:0 (0,388 $\mu\text{g g}^{-1}$).

2.3.2 Kazan MV

Η συγκέντρωση των θειικών ιόντων του νερού των πόρων μειώθηκε σημαντικά, από τιμές κοντά στα 30 mM που έχει στη διάφραση νερού-ιζήματος του πυθμένα, σε τιμές μικρότερες του 1 mM στα 15 cmbsf (Σχήμα 2.5). Η συγκέντρωση των θειικών παραμένει χαμηλή στο βαθύτερο μισό του πυρήνα.



Σχήμα 2.5 Κατακόρυφη κατανομή του μεθανίου [methane], θειικών ιόντων [sulfate] και θειούχων ιόντων [sulfide] στη θέση AN07BC01 του Kazan MV (τροποποιημένο από Kormas *et al.* 2008)

Τα θειούχα ιόντα παρουσίασαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα πρώτα εκατοστά αλλά αυξάνεται σημαντικά από τα 5 cmbsf και μέχρι τα 13 cmbsf, όπου πήραν και τη μέγιστη τιμή τους στα 13 mmol l^{-1} νωπού ιζήματος. Στη συνέχεια η συγκέντρωση των θειούχων

μειώθηκε μέχρι τα 25 cmbsf, όπου πρακτικά μηδενίστηκε.

Το μεθάνιο που μετρήθηκε είχε χαμηλή συγκέντρωση στα επιφανειακά ιζήματα αλλά οι τιμές του αυξήθηκαν σημαντικά από τα 10 ως τα 16 cmbsf. Στους βαθύτερους ορίζοντες διατηρήθηκαν τιμές υψηλότερες από τις τιμές κορεσμού στο θαλάσσιο νερό, ωστόσο καταγράφηκε ένα τοπικό ελάχιστο στα 25 cmbsf, το οποίο συνοδεύτηκε και από μικρή αύξηση των θειικών ιόντων.

2.3.2.1 Ανάλυση του κλάσματος των αλκοολών

Οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο κλάσμα των αλκοολών παρατίθενται στον Πίνακα 2.3. Η τιμή της συγκέντρωσης της sn-2-υδροξυαρχαιόλη για το Kazan MV ξεκινάει από 0,231 $\mu\text{g g}^{-1}$ για τον πιο επιφανειακό, από τους ορίζοντες που εξετάστηκαν, παρουσιάζει δύο τοπικά μέγιστα στα 5-10 cmbsf (1,449 $\mu\text{g g}^{-1}$) και στα 15-20 cmbsf (1,628 $\mu\text{g g}^{-1}$) και παίρνει τη χαμηλότερη τιμή της στο βαθύτερο ορίζοντα (0,089 $\mu\text{g g}^{-1}$). Τα μέγιστα που παρατηρούνται είναι σε συμφωνία με το πρότυπο κατανομής των θειικών-μεθανίου, καθώς το πρώτο ακολουθεί την πρωταρχική ζώνη μετάβασης που φάνηκε να είναι στα 7-15 cmbsf ενώ το πιο «βαθύ» μέγιστο ακολουθεί τη μικρότερη αύξηση θειικών-μείωση μεθανίου περίπου στα 22 cmbsf.

Η αρχαιόλη παρουσίασε κατακόρυφο πρότυπο κατανομής των συγκεντρώσεων με σχετικά υψηλές τιμές στα 5-10 cmbsf (0,672 $\mu\text{g g}^{-1}$) και στα 20-25 cmbsf (0,498 $\mu\text{g g}^{-1}$) και χαμηλές τιμές στα 0-5 cmbsf (0,045 $\mu\text{g g}^{-1}$) και 25-30 cmbsf (0,102 $\mu\text{g g}^{-1}$). Η sn-3-υδροξυαρχαιόλη είχε την υψηλότερη συγκέντρωσή της, 0,087 $\mu\text{g g}^{-1}$, στον επιφανειακό ορίζοντα και τη χαμηλότερη στα

Πίνακας 2.3 Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρού βάρους ιζήματος) των σημαντικότερων βιοδεικτών του κλάσματος των αλκοολών στο Kazan MV

	Βάθος (cmbsf)					
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
MAGE C14	0,062	0,031	0,015	0,048	0,018	0,007
MAGE iC15	0,155	0,079	0,010	0,005	0,000	0,004
MAGE aiC15	0,083	0,005	0,019	0,006	0,000	0,006
MAGE C15	0,537	0,017	0,013	0,026	0,016	0,002
MAGE C16:1 ω 7	0,225	0,182	0,028	0,031	0,036	0,000
MAGE C16:1 ω 5	0,000	0,108	0,015	0,028	0,020	0,010
MAGE C16	0,095	0,188	0,032	0,086	0,052	0,006
MAGE 10MeC16:0	0,026	0,163	0,040	0,039	0,029	0,031
MAGE C17:1 ω 8	0,317	0,090	0,016	0,007	0,011	0,000
MAGE cyC17:0 ω 5,6	0,394	0,052	0,011	0,028	0,046	0,008
MAGE C18:1 ω 5	0,082	0,054	0,000	0,000	0,000	0,000
MAGE C18:1 ω 7	0,129	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000
cholesterol	17,239	5,029	9,305	0,023	0,390	0,060
cholestanol	1,084	1,422	6,784	0,070	0,421	0,024
4Methylsterol	0,312	0,775	0,498	0,016	0,053	0,242
Tetrahymanol	0,249	0,490	0,189	0,104	0,174	0,000
DAGE C30:0	0,149	0,105	0,000	0,000	0,068	0,047
DAGE C31:1b	0,000	0,065	0,023	0,182	0,219	0,109
DAGE C32:2a	0,074	0,044	0,120	0,047	0,234	0,011
DAGE C32:0	0,153	0,087	0,022	0,022	0,054	0,011
DAGE C32:1	0,030	0,051	0,161	0,061	0,102	0,023
DAGE C33:2	0,020	0,000	0,016	0,164	0,194	0,041
DAGE C33:0	0,018	0,161	0,031	0,067	0,040	0,000
DAGE C34:2	0,050	0,093	0,000	0,104	0,227	0,000
DAGE C34:0	0,000	0,000	0,000	0,025	0,060	0,000
archaeol	0,045	0,672	0,182	0,329	0,498	0,102
sn-2-hydroxyarchaeol	0,231	1,449	0,396	0,787	1,628	0,089
sn-3-hydroxyarchaeol	0,087	0,058	0,013	0,054	0,049	0,037
di-OH-archaeol	0,000	0,131	0,039	0,058	0,059	0,017
ext.OH-archaeol	0,000	0,269	0,040	0,009	0,035	0,007
OH-arch/arch	5,14	2,16	2,17	2,40	3,27	0,87

Πίνακας 2.4 Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρού βάρους ιζήματος) των σημαντικότερων βιοδεικτών του κλάσματος των λιπαρών οξέων στο Kazan MV

	Βάθος (cmbsf)					
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30
C14	0,704	0,618	0,385	0,135	0,065	0,088
iC15	0,278	0,105	0,109	0,039	0,010	0,016
aiC15	0,386	0,121	0,224	0,093	0,022	0,031
C15	0,177	0,101	0,087	0,061	0,063	0,060
iC16	0,000	0,000	0,020	0,001	0,006	0,006
C16:1 ω 7c	5,639	3,811	0,199	0,033	0,072	0,056
C16:1 ω 7t	0,561	0,152	0,036	0,000	0,000	0,000
C16:1 ω 5c	1,272	0,490	0,467	0,137	0,000	0,000
C16	2,306	1,141	0,470	0,439	0,453	0,446
10MeC16	0,203	0,137	0,142	0,019	0,008	0,000
iC17	0,086	0,036	0,027	0,020	0,006	0,022
aiC17	0,173	0,062	0,032	0,015	0,028	0,019
C17:1 ω 8	0,134	0,062	0,052	0,011	0,000	0,000
C17:1 ω 6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
cyC17:0 ω 5,6	0,139	0,138	0,785	0,158	0,028	0,033
C17	0,172	0,065	0,041	0,055	0,050	0,065
C18:2	0,000	0,158	0,036	0,000	0,028	0,031
C18:1 ω 9	0,364	0,237	0,056	0,047	0,094	0,087
C18:1 ω 7c	2,990	1,606	0,067	0,010	0,000	0,013
C18:1 ω 7t	0,288	0,248	0,000	0,000	0,000	0,000
C18:1 ω 5	0,027	0,036	0,034	0,000	0,000	0,000
C18	0,805	0,590	0,328	0,375	0,377	0,401
$\alpha\beta$ -C32 hopanoic acid	0,084	0,095	0,085	0,101	0,024	0,178
$\beta\beta$ -C32 hopanoic acid	0,113	0,081	0,074	0,198	0,089	0,227
<hr/>						
aiC15/ iC15	1,39	1,15	2,05	2,38	2,24	1,86
C16:1 ω 5c/ iC15	4,57	4,67	4,29	3,52	0,00	0,00
C16:1 ω 7t/C16:1 ω 7c	0,10	0,04	0,18			
C18:1 ω 7t/C18:1 ω 7c	0,10	0,15				

10-15 cmbsf ($0,013 \mu\text{g g}^{-1}$).

Οι μορφές της εκτεταμένης υδροξυαρχαιόλης και της δι-υδροξυαρχαιόλης δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου στον επιφανειακό ορίζοντα αλλά παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές τους στο αμέσως επόμενο ορίζοντα ιζήματος, 5-10 cmbsf ($0,269$ και $0,131 \mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα).

Οι γλυκερολοιαθέρες στη μονοάκυλο μορφή τους, MAGEs, εμφανίζουν τις

υψηλότερες συγκεντρώσεις τους στα 0-5 cmbsf, ενώ οι περισσότεροι από τους διαλκυλο-γλυκερολοιαθέρες, DAGEs, παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις στα 20-25 cmbsf. Ανιχνεύθηκαν και αλκοόλες βραχείας αλυσίδας με την αντίστοιχη δομή των λιπαρών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες και παρόμοιο πρότυπο κατανομής, για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται αναλυτικά.

Πολύ υψηλές τιμές χοληστ-5-εν-3β-όλης (χοληστερόλης) και 5α(H)-Χολεστέαν-3β-όλης (χοληστανόλης) μετρήθηκαν στο πρώτο μισό που πυρήνα του Kazan MV. Η χοληστερόλη παρουσίασε τη μέγιστη τιμή της 17,239 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 0-5 cmbsf ενώ η χολεστανόλη αντίστοιχα στα 10-15 cmbsf (6,784 $\mu\text{g g}^{-1}$). Η 4α-μεθυλοχολεστ-8(14)-εν-3β-όλη (4-μεθυλοστερόλη) ανιχνεύθηκε και στο Kazan MV με μέγιστη τιμή 0,775 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 10-15 cmbsf.

2.3.1.2 Ανάλυση του κλάσματος των λιπαρών οξέων

Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων του Kazan MV που καταγράφηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4. Το C16:1ω7c φαίνεται να είναι το λιπαρό οξύ με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους δύο ρηχότερους ορίζοντες, 0-5 και 5-10 cmbsf (5,639 και 3,811 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα) ενώ ως επόμενο πιο άφθονο παρουσιάζεται το C18:1ω7c (2,990 και 1,606 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα). Το κορεσμένο λιπαρό οξύ C16:0 εμφανίζει επίσης υψηλές τιμές και για τους δύο αυτούς ορίζοντες (2,306 και 1,141 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα). Το C16:1ω5c μετρήθηκε 1,272 $\mu\text{g g}^{-1}$ στον επιφανειακό ορίζοντα. Η συγκέντρωσή του μειώνεται στα 5-10 cmbsf (0,490 $\mu\text{g g}^{-1}$), στα 10-15 (0,467 $\mu\text{g g}^{-1}$) και στα 15-20 cmbsf (0,137 $\mu\text{g g}^{-1}$) ενώ δεν βρίσκεται σε ανιχνεύσιμη συγκέντρωση στα βαθύτερα στρώματα. Στον ορίζοντα των 10-15 cmbsf, βρέθηκε ότι κυριαρχεί το cyC17:0ω5,6 (0,785 $\mu\text{g g}^{-1}$). Οι συγκεντρώσεις αυτού του λιπαρού οξέος κυμάνθηκαν κοντά στο 0,138 $\mu\text{g g}^{-1}$ για τους πιο ρηχούς ορίζοντες, ενώ πήραν τιμές 0,158 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 15-20 cmbsf και περίπου 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ στα 20-25 και 25-30 cmbsf.

Στους ορίζοντες ιζήματος του βαθύτερου μισού του πυρήνα (15 μέχρι 30 cmbsf) τα λιπαρά οξέα που μετρήθηκαν παρουσιάζουν μικρές συγκεντρώσεις (σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και μία τάξη

μεγέθους) σε σχέση με τους ορίζοντες ιζήματος του που βρίσκονται στο άνω μισό του πυρήνα. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει το C16:0 (0.439, 0.453 και 0.446 $\mu\text{g g}^{-1}$ στους ορίζοντες 15-20, 20-25 και 25-30 cmbsf αντίστοιχα).

Ωστόσο, διαφορετική κατακόρυφη κατανομή, σε σχέση με τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που φαίνεται να μειώνονται στο βαθύτερο ορίζοντα, παρουσιάζουν τα οπανοϊκά οξέα που λαμβάνουν τις μεγαλύτερες τιμές τους σε αυτόν.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρότυπο κατανομής των θειικών και του μεθανίου παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο θέσεων που εξετάστηκαν. Το προφίλ που προέκυψε για το Kazan MV φαίνεται να είναι σε αντιστοιχία με προηγούμενες έρευνες στο ίδιο ηφαίστειο όπου η ζώνη μετάβασης θειικών-μεθανίου (και επομένως η ζώνη της μέγιστης AOM) τοποθετείται μεταξύ 7-16 cmbsf (Werne *et al.* 2002, Haese *et al.* 2003). Στο Amsterdam MV, η ζώνη μετάβασης φαίνεται να βρίσκεται μερικά εκατοστά βαθύτερα. Η παρατήρηση αυτή συνάδει και με την κατανομή αντίστοιχα των χαρακτηριστικών λιπαρών οξέων και αλκοολών στις δύο θέσεις. Στο Kazan MV, όπως θα συζητηθεί αναλυτικά και παρακάτω, υψηλές συγκεντρώσεις μετρήθηκαν στο επιφανειακό μισό του πυρήνα (μέχρι περίπου τα 15 cmbsf) ενώ στο Amsterdam MV οι τιμές των βιοδεικτών παραμένουν υψηλές μέχρι τα 25 cmbsf.

Οι συγκεντρώσεις των θειικών είχαν παρόμοιο εύρος τιμών και στα δύο ηφαίστεια υλός, ενώ οι συγκεντρώσεις του μεθανίου φαίνεται να είναι μικρότερες στο Amsterdam MV. Ωστόσο, το ενδιαφέρον κυρίως εστιάζεται στο πρότυπο μεταβολής των τιμών με το βάθος και στο βάθος δημιουργίας της ζώνης μετάβασης θειικών-μεθανίου, καθώς οι *in situ*

συγκεντρώσεις του μεθανίου μπορεί να είναι πολύ υψηλότερες. Ειδικά στα ιζήματα που φέρουν μεθανιοϋδρίτες λόγω του υπερκορεσμού τους σε διαλυμένο μεθάνιο αλλά και της αποσταθεροποίησης των μεθανιοϋδριτών πιστεύεται ότι κατά την ανάκτηση των πυρήνων σημαντικό ποσό, μέχρι και το 99,5%, του μεθανίου μπορεί να διαφεύγει (Bohrmann & Torres 2006).

2.4.1 Βιοδείκτες των Archaea

Ο διαγνωστικός βιοδείκτης των Archaea που φαίνεται να επικρατεί στα ιζήματα των ηφαιστειών ιλύος της ανατολικής Μεσογείου που εξετάστηκαν είναι η *sn-2*-υδροξυαρχαιόλη, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις βρέθηκε η αρχαιόλη. Ο μοναδικός ορίζοντας στον οποίο παρατηρήθηκε επικράτηση της αρχαιόλης έναντι της *sn-2*-υδροξυαρχαιόλης είναι το βαθύτερο τμήμα (25-30 cmbsf) του ιζήματος που μελετήθηκε από το Kazan MV. Η αρχαιόλη έχει βρεθεί σε διάφορες ομάδες των Archaea και θεωρείται ευρύτερης εξάπλωσης (Boucher 2007). Ωστόσο, τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις, όσο αυτές που μετρήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη (της τάξεως των εκατοντάδων ng ή και μg ανά g ιζήματος) έχουν καταγραφεί μέχρι στιγμής μόνο σε πλούσια σε μεθάνιο περιβάλλοντα.

Οι υδροξυαρχαιόλες, ωστόσο έχουν ανιχνευθεί μόνο σε μερικά στελέχη κυρίως των Methanosarcinales (και δευτερευόντως) των Methanopyrales, Thermoplasmatales και Sulfolobales (Sprott 1992, Koga *et al.* 1993b, Koga *et al.* 1998, Koga & Morii 2005). Η παρουσία των υδροξυλιωμένων ισοπρενοειδών διαιθερικών λιπιδίων θεωρείται ως χημειοταξικός παράγοντας των Methanosarcinales (Sprott *et al.* 1993). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των υδροξυλιωμένων μορφών της αρχαιόλης και κυρίως της *sn-2*-υδροξυαρχαιόλης έχει συσχετιστεί με τη

διενέργεια AOM (Elvert *et al.* 2000, Hinrichs *et al.* 2000a, Orphan *et al.* 2001a, Orphan *et al.* 2001b, Pancost *et al.* 2001b, Hinrichs & Boetius 2002, Teske *et al.* 2002, Elvert *et al.* 2005).

Τα δύο υποθαλάσσια ηφαιστεια ιλύος Amsterdam και Kazan που εξετάστηκαν εμφανίζουν διαφορές τόσο στις συγκεντρώσεις της αρχαιόλης και των διαφόρων μορφών υδροξυαρχαιόλης, όσο και στο κατακόρυφο πρότυπο κατανομής αυτών. Το Amsterdam MV εμφάνισε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως *sn-2*-υδροξυαρχαιόλης αλλά και αρχαιόλης σε όλο το μήκος του πυρήνα που μελετήθηκε με μέγιστη συγκέντρωση στον ορίζοντα 15-20 cmbsf, όπου πιθανό να βρίσκεται η ζώνη μετάβασης θεικών-μεθανίου σύμφωνα με τη σε βάθος κατανομή αυτών.

Οι τιμές αυτές είναι οι μεγαλύτερες που έχουν καταγραφεί, μέχρι στιγμής για ιζήματα που προέρχονται από ηφαιστεια ιλύος. Οι Pancost *et al.* (2000) ανέφεραν επιφανειακή τιμή (σε κάποια θέση του Amsterdam MV που χαρακτηρίστηκε ως ανάβλυση) 4,3 μg g⁻¹ *sn-2*-υδροξυαρχαιόλης με την αρχαιόλη να ξεπερνάει αυτή την τιμή και να φτάνει στα 6,9 μg g⁻¹. Ωστόσο δεν υπάρχει κατακόρυφο προφίλ λιπιδιακών βιοδεικτών για αυτή τη θέση, ούτε και γεωχημικές μετρήσεις μεθανίου, θεικών οπότε δεν είναι εύκολο να γίνουν συγκρίσεις.

Όσον αφορά άλλες θέσεις ηφαιστειών ιλύος, για τις οποίες υπάρχουν περισσότερα δεδομένα, οι τιμές που μετρήθηκαν στο Amsterdam MV είναι τουλάχιστον 10 φορές υψηλότερες πχ από αντίστοιχες τιμές των ηφαιστειών ιλύος Captain Arutyunov and Bonjardim, στον Κόλπο του Cadiz, δυτική Μεσόγειος (Niemann *et al.* 2006a), αλλά και του ηφαιστειού ιλύος Haakon Mobsy στη Βόρεια Θάλασσα (Niemann *et al.* 2006b). Για τα ηφαιστεια ιλύος της δυτικής Μεσογείου οι ενδείξεις έδειξαν ότι η ζώνη μετάβασης

βρίσκεται επίσης αρκετά βαθιά, μεταξύ 20 και 40 cmbsf (Niemann *et al.* 2006ab). Το Haakon Mosby MV, από την άλλη μεριά, φάνηκε να παρουσιάζει ετερογένεια στο βάθος της ζώνης μετάβασης αλλά γενικά βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια, 4- 10 cmbsf.

Σε ιζήματα, υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα 7,986 $\mu\text{g g}^{-1}$ που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία, έχουν καταγραφεί στη Λεκάνη του Guaymas (Teske *et al.* 2002) και στη Ράχη του Hydrate (Elvert *et al.* 2005), με μέγιστες τιμές συγκεντρώσεων της *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης περίπου 14 $\mu\text{g g}^{-1}$ και αφορούν θέσεις υψηλής ενεργότητας AOM. Επίσης, υψηλή συγκέντρωση *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης μετρήθηκε και σε ιζήματα του Κόλπου του Μεξικού (9,3 $\mu\text{g g}^{-1}$) που φέρουν μεθανιοϋδρίτες (Orcutt *et al.* 2005) αλλά δε σχετίζονται με δομές υποθαλάσσιων ηφαιστειών ιλύος ενώ η υψηλότερη τιμή που έχει αναφερθεί (41,6 $\mu\text{g g}^{-1}$) βρέθηκε στην ίδια περιοχή (Zhang *et al.* 2003) και αφορά ιζήματα μεθανιοϋδριτών με ταυτόχρονη παρουσία πετρελαιοειδών.

Στην εργασία των Teske *et al.* (2002) μετρήθηκε αντίστοιχα υψηλή συγκέντρωση αρχαιόλης και η βιοκοινότητα των Archaea που χαρακτηρίστηκε μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης του 16S rRNA γονιδίου συσχετίστηκε με την ομάδα ANME-1. Στη μελέτη των Elvert *et al.* (2005) η συγκέντρωση της αρχαιόλης που μετρήθηκε ήταν τέσσερις φορές χαμηλότερη από αυτή της *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης όπως στο ίζημα του Amsterdam MV και οι ερευνητές απέδωσαν τη βιοκοινότητα των Archaea στην ANME-2 ομάδα. Οι Knittel *et al.* (2005) εξετάζοντας ίζημα από την ίδια θέση χρησιμοποιώντας φυλογενετικές αναλύσεις βρήκαν ότι πράγματι η επικρατούσα βιοκοινότητα των Archaea ανήκε στην ομάδα των ANME-2, συνυπήρχαν όμως και Archaea

της ANME-1 ομάδας. Αντίστοιχα αποτελέσματα βρέθηκαν και στην εργασία των Orcutt *et al.* (2005).

Γενικά, ο λόγος της υδροξυαρχαιόλης προς την αρχαιόλη θεωρείται διαγνωστικός δείκτης της επικράτησης της ομάδας ANME-1 ή ANME-2/ANME-3 των Archaea. Μικροβιακοί τάπητες και ιζήματα ιλύος ψυχρών αναβλύσεων της Μαύρης Θάλασσας και της Ράχης του Hydrate, στα οποία επικρατούν Archaea της ομάδας ANME-2 έχουν βρεθεί να περιέχουν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης σε σχέση με την αρχαιόλη συγκριτικά με αντίστοιχους τάπητες και ιζήματα όπου κυριαρχούν ANME-1 Archaea (Blumenberg *et al.* 2004, Elvert *et al.* 2005). Ο λόγος των δύο αυτών ενώσεων έχει προταθεί ως εργαλείο αποτύπωσης των Archaea βιοκοινοτήτων και το χαρακτηρισμό τους ως ANME-1 ή ANME-2 (Blumenberg *et al.* 2004) Συνοψίζοντας τα δημοσιευμένα μέχρι σήμερα δεδομένα, ο λόγος *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης προς αρχαιόλη παρουσιάζει εύρος από 0,0 ως 0,8 στα συστήματα που κυριαρχούν τα ANME-1, ενώ τιμές του λόγου από 1,1 ως 5,5 προκύπτουν για τα συστήματα που επικρατούν τα ANME-2/ANME-3. Στα συστήματα αυτά υψηλή τιμή του λόγου (>3,5) αντιστοιχεί σε κοινότητες Archaea που αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από ANME-2 ενώ για μικρότερες τιμές αυτού υπάρχει συμβολή και ANME-1 Archaea στη βιοκοινότητα (Boetius *et al.* 2000, Teske *et al.* 2002, Knittel *et al.* 2003, Blumenberg *et al.* 2004, Elvert *et al.* 2005, Knittel *et al.* 2005, Orcutt *et al.* 2005, Stadnitskaia *et al.* 2005, Niemann *et al.* 2006a).

Για το διαχωρισμό της ομάδας ANME-3 από τα ANME-2, δεν έχουν προταθεί, προς το παρόν, χαρακτηριστικοί βιοδείκτες ή διαγνωστικοί δείκτες. Τα ANME-2 και ANME-3 ανήκουν στην ίδια τάξη, τα Methanosarcinales,

και η χημειοταξινομική δεν είναι δυνατό να διαχωρίσει ομάδες κάτω από αυτό το ταξινομικό όριο, στην περίπτωση τουλάχιστον των περιβαλλοντικών δειγμάτων. Επίσης, η ομάδα των ANME-3 δημιουργήθηκε σχετικά πρόσφατα (Niemann *et al.* 2006b, Lösekann *et al.* 2007) και για το λόγο αυτό είναι πιθανόν η λιγότερο μελετημένη. Επίσης, αν και αντιπρόσωποι της ομάδας αυτής έχουν βρεθεί σε βιβλιοθήκες κλώνων από διάφορα περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο, το μόνο, σύμφωνα με τις εργασίες που έχουν δημοσιευθεί, ενδιαίτημα στο οποίο επικρατούν βρίσκεται στο ηφαιστειο ιλύος Haakon Mosby. Επομένως είναι δύσκολο, αφού δεν υπάρχουν καλλιεργημένοι αντιπρόσωποι να μελετηθεί επαρκώς με τα εργαλεία της μικροβιακής οικολογίας.

Ο λόγος *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης προς αρχαιόλη για το Amsterdam MV έδωσε τιμές για όλους τους ορίζοντες μεγαλύτερους από 2, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύστημα που μελετήθηκε, αποτελείται κυρίως από ANME-2 αλλά με τη συμβολή, σε κάποιες περιπτώσεις των ANME-1.

Στο ίζημα του Kazan MV οι τιμές των βιοδεικτών για τα Archaea που μετρήθηκαν είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες από το Amsterdam MV. Ωστόσο, οι τιμές αυτές είναι μέσα στο εύρος τιμών που έχουν καταγραφεί σε ιζήματα ηφαιστειών ιλύος (Werne & Sinninghe Damsté 2005, Niemann *et al.* 2006a, Niemann *et al.* 2006b) και λίγο υψηλότερες από τιμές που έχουν μετρηθεί σε άλλη θέση⁸ του ίδιου ηφαιστείου (Werne *et al.* 2002, Werne *et al.* 2004, Werne & Sinninghe Damsté 2005) από ίζημα που συλλέχθηκε με την αποστολή MEDINETH, 1999. Η

⁸ βρίσκεται μόλις 30 m βοριότερα, σύμφωνα με τις δημοσιευμένες συντεταγμένες, από τη θέση δειγματοληψίας της παρούσας μελέτης

υδροξυαρχαιόλη⁹ που μετρήθηκε στις προαναφερθείσες εργασίες των Werne και συνεργατών παρουσιάζει στα 17 cmbsf μέγιστη τιμή 0,93 $\mu\text{g g}^{-1}$. Η τιμή της αρχαιόλης σε αυτό τον ορίζοντα μετρήθηκε στα 0,32 $\mu\text{g g}^{-1}$ ενώ σε όλο το μήκος του πυρήνα που εξετάστηκε (1 ως 28 cmbsf) ο λόγος υδροξυαρχαιόλης προς αρχαιόλη κυμαίνεται κοντά στο 3. Μέσω της φυλογενετική ανάλυση ιζημάτων από την ίδια θέση, διαπιστώθηκε ότι η ομάδα των Archaea ANME-2 ήταν κυρίαρχη σε αυτά τα ιζήματα (Heijs *et al.* 2005), γεγονός που συμφωνεί με το δείκτη διαχωρισμού των ANME που αναφέρθηκε παραπάνω.

Τα δεδομένα που προκύπτουν, ωστόσο, από τις μετρήσεις που διενεργήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας και παρατέθηκαν στον πίνακα 2.2 δείχνουν ότι έχουμε διαφορές στη σύσταση των βιοκοινοτήτων και την κατακόρυφη μεταβολή αυτών μεταξύ των δύο θέσεων. Αν και υπάρχει διαφορά στη μεθοδολογική προσέγγιση μεταξύ της μελέτης που παρατίθεται εδώ (θέση AN07BC01, ANAXIMANDER) και σε αυτή που προηγήθηκε (θέση MNLBC19, MEDINETH) μπορούν να γίνουν κάποιες συγκριτικές παρατηρήσεις, κυρίως για τον πιο επιφανειακό και το βαθύτερο ορίζοντα των δύο πυρήνων, όπου οι διαφορές είναι εντονότερες.

Στο επιφανειακό ίζημα του πυρήνα MNLBC19 απουσίασαν (1 cm) ή ήταν ελάχιστες (2,5 cm) οι ποσότητες αρχαιόλης και υδροξυαρχαιόλης ενώ από τις αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν δεν βρέθηκαν Archaea που να ανήκουν στα ANME. Αντίθετα, στον ορίζοντα ιζήματος 0-5 cm του AN07BC01, μετρήθηκε πολύ μικρή ποσότητα αρχαιόλης σε σχέση με την *sn*-2 και *sn*-3 υδροξυαρχαιόλη, έχοντας ως

⁹ αν και αρχικά αναγνωρίστηκε και δημοσιεύτηκε ως *sn*-3-υδροξυαρχαιόλη, πρόκειται για την *sn*-2 μορφή αυτής (Niemann & Elvert, 2008)

αποτέλεσμα τη διαμόρφωση ενός πολύ υψηλού δείκτη διαχωρισμού των ANME που υποδεικνύει την επικράτηση των ANME-2/ANME-3, ένδειξη που επιβεβαιώνεται και από τις βιβλιοθήκες κλώνων από το ίδιο ίζημα (κεφάλαιο 3).

Στο βαθύτερο ορίζοντα του πυρήνα MNLBC19 που αναλύθηκε (28 cm) τόσο ο δείκτης λιπιδιακών βιοδεικτών όσο και οι βιβλιοθήκες κλώνων που κατασκευάστηκαν συγκλίνουν στην επικράτηση των ANME-2. Από την άλλη μεριά, ο ορίζοντας ιζήματος 25-30 cm του AN07BC01, αποκάλυψε σχεδόν ίσες ποσοότητες υδροξυαρχαιόλης και αρχαιόλης με λόγο περίπου μονάδα, υποδηλώνοντας σημαντική συμβολή των ANME-1 σε αυτό τον ορίζοντα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την αντίστοιχη φυλογενετική ανάλυση (κεφάλαιο 3).

Η παρουσία της C_{20,25} (ή αλλιώς «εκτεταμένης») μορφής υδροξυαρχαιόλης έχει συνδεθεί κυρίως με την παρουσία της ομάδας ANME-2 (Stadnitskaia *et al.* 2008). Η εκτεταμένη μορφή υδροξυαρχαιόλης έχει βρεθεί κυρίως σε ενεργές περιοχές AOM της Ανατολικής Μεσογείου, μεταξύ αυτών και σε ίζημα από το Kazan MV, χωρίς όμως να έχουν δημοσιευτεί τιμές συγκεντρώσεων για κάποια από τις περιοχές αυτές.

Πιστεύεται ότι σχετίζεται με περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο όπου συνυπάρχει και αυξημένη αλατότητα, λόγω της ύπαρξης κοιτασμάτων εβαποριτών (Stadnitskaia *et al.* 2008). Η υδροξυλίωση ενός διαιθέρα επιφέρει πιθανότατα αλλαγές στις ιδιότητες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Spratt 1992). Η υδροξυλίωση των διφυτανίων για την δημιουργία υδροξυτετρααιθέρων ή η υδροξυλίωση του έβδομου άνθρακα σε υδροξυδιαιθέρες δεν έχει αναφερθεί σε κανένα από τα καλλιεργημένα στελέχη. Δεν είναι

γνωστό ποιοί είναι οι οικολογικοί παράγοντες που οδηγούν τα αναερόβια μεθανιότροφα Archaea στη βιοσύνθεση της εκτεταμένης sn-2 υδροξυαρχαιόλης. Ωστόσο, η παρουσία C_{20,25} ισοπρενοειδών διαιθερικών λιπιδίων σε αλόφιλα Archaea (Tachibana 1994, Wang *et al.* 2007) και η χρήση του μη-υδροξυλιωμένου C_{20,25} ισοπρενοειδούς διαιθερικού λιπιδίου ως βιοδείκτη αλόφιλων Archaea σε πρόσφατους και Τεταρτογενούς halites (Teixidor *et al.* 1993) υποδεικνύουν ότι η εκτεταμένη sn-2 υδροξυαρχαιόλη παράγεται αποκλειστικά από Archaea της ANME-2 ομάδας που αναπτύσσονται σε ψυχρές αναβλύσεις αυξημένης αλατότητας.

2.4.2 Βιοδείκτες των Bacteria

Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων που μετρήθηκαν στα ιζήματα των ηφαιστειών υλύος Amsterdam και Kazan είναι μία έως δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερες από τιμές που έχουν καταγραφεί σε ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου (Polymenakou *et al.* 2005b, Polymenakou *et al.* 2006). Τα «ασυνήθιστα» λιπαρά οξέα C_{16:1ω5c}, C_{16:1ω7t}, C_{16:1ω7c}, 10MeC₁₆, γC_{17:0ω5,6}, C_{18:1ω7c} - η παρουσία των οποίων έχει σχετιστεί με κοιτάσματα ενυδατωμένων υδρογονανθράκων και αντίστοιχα περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο - έχουν σημαντική παρουσία στα ιζήματα των δύο ηφαιστειών υλύος που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα υποθαλάσσια ηφαίστεια υλύος Amsterdam και Kazan παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο κατακόρυφης κατανομής των λιπαρών οξέων και διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών αλλά και στις δύο περιπτώσεις οι τιμές που μετρήθηκαν βρίσκονται στο εύρος τιμών που έχουν αναφερθεί σε περιβάλλοντα ψυχρών αναβλύσεων (Elvert *et al.* 2003, Elvert *et al.*

2005, Orcutt *et al.* 2005, Niemann *et al.* 2006a, Niemann *et al.* 2006b, Wegener *et al.* 2008). Στις προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει για το ηφαίστειο υλός Kazan, είτε δεν περιλαμβάνονται αναλύσεις λιπαρών οξέων των ιζημάτων σε αυτά είτε, αν και αναφέρεται ανίχνευσή τους, δε δημοσιεύονται οι αντίστοιχες τιμές (Pancost *et al.* 2000, Werne *et al.* 2002, Werne *et al.* 2004, Werne & Sinninghe Damsté 2005).

Η κυριαρχία των λιπαρών οξέων C16:1ω7c C18:1ω7c στους ορίζοντες ιζημάτων 0-5 και 5-10 cmbsf και στα δύο ηφαίστεια υλός που μελετήθηκαν αντικατοπτρίζει τη σημαντική συμβολή των θειοξειδωτικών Bacteria στη σύσταση της βιοκοινότητας για αυτούς τους ορίζοντες. Οι φυλογενετικές αναλύσεις (κεφάλαιο 3) επιβεβαίωσαν αυτή την παρατήρηση καθώς ήταν μεγάλη η παρουσία φυλοτύπων που ανήκουν σε θειοξειδωτικά Bacteria στις αντίστοιχες βιβλιοθήκες κλώνων.

Οι συγκεντρώσεις των βιοδεικτών C16:1ω7c και C18:1ω7c είναι περίπου διπλάσιες για το Kazan MV σε σχέση με το Amsterdam. Αν ισχύει η υπόθεση ότι η μέση τιμή της περιεκτικότητας των βιοδεικτών αυτών είναι ίδια και στις δύο βιοκοινότητες των ηφαιστειών, το επιφανειακό ίζημα του Kazan MV εμπεριέχει το διπλάσιο περίπου αριθμό κυττάρων θειοξειδωτικών Bacteria. Ωστόσο, από την κατακόρυφη κατανομή των βιοδεικτών φαίνεται ότι για το Amsterdam MV, αυτοί παραμένουν σε αρκετά μεγάλες ποσότητες μέχρι τα 25 cmbsf και παρουσιάζουν σημαντική μείωση μόνο στο βαθύτερο ορίζοντα των ιζημάτων άρα και οι παραγωγοί τους αντίστοιχα έχουν παρουσία σε αυτό το μήκος του πυρήνα. Από την άλλη μεριά, στο Kazan MV, καταγράφηκε σημαντική μείωση των βιοδεικτών από τα 10-15 cmbsf, η οποία συνεχίζεται και στους επόμενους ορίζοντες.

Οι βιοδείκτες C16:1ω5c, aiC15 και 10MeC16 που καταγράφηκαν στους επιφανειακούς ορίζοντες των ηφαιστειών Amsterdam και Kazan που εξετάστηκαν δείχνουν ότι και θεικοαναγωγικά Bacteria μετέχουν ενεργά στις προκαρυωτικές βιοκοινότητες. Στα 10-15 cmbsf τη μεγαλύτερη τιμή σε αυτή την κατηγορία βιοδεικτών και στα δύο ηφαίστεια υλός παίρνει το λιπαρό οξύ cyC17:0ω5,6 γεγονός που υποδηλώνει ότι διαφορετικοί θεικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί επικρατούν σε αυτό τον ορίζοντα. Οι τιμές του cyC17:0ω5,6 αυξάνονται στους βαθύτερους ορίζοντες ως τα 25 cmbsf αυξάνονται για το Amsterdam MV αλλά μειώνονται για το Kazan MV, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και από τα προφίλ μεθανίου και θεικών, που μετατοπίζουν αντίστοιχα τις ζώνες μετάβασης και τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται λόγω ευνοϊκών συνθηκών σε κάθε ορίζοντα.

Τα λιπαρά οξέα aiC15 και iC15 φαίνεται να έχουν παρουσία σε όλα τα περιβάλλοντα AOM που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα και η σχετική τους αφθονία χρησιμοποιείται στις προσπάθειες προσδιορισμού του είδους του οικοσυστήματος AOM που επικρατεί σε κάθε περιβάλλον. Οι τιμές του λόγου aiC15 προς iC15 τείνουν να είναι υψηλότερες όταν επικρατούν βιοκοινότητες ANME-1/Seep-SRB1 σε σύγκριση με τις τιμές που προκύπτουν για τις βιοκοινότητες που κυριαρχούν τα ANME-2/Seep-SRB1. Επομένως, αν και αφορά ενώσεις προερχόμενες από Bacteria, ο δείκτης χρησιμοποιείται ουσιαστικά για να χαρακτηρίσει τα Archaea που διενεργούν AOM συζευγμένη όμως με θεική αναγωγή.

Τιμές του λόγου >2 θεωρούνται ενδεικτικές για τα ANME-1 συστήματα (Blumenberg *et al.* 2004, Niemann *et al.* 2005), ωστόσο υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη

τιμών για τα δύο συστήματα οπότε με τη χρήση αυτού του δείκτη μόνο δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Οι τιμές που παρατηρήθηκαν φαίνεται να δίνουν λόγο που αυξάνεται από τον επιφανειακότερο ορίζοντα προς το βαθύτερο ορίζοντα τόσο στο Amsterdam όσο και στο Kazan MV, ενώ για τον ίδιο ορίζοντα η τιμή του λόγου είναι μικρότερη για το Kazan σε σχέση με το Amsterdam. Αν δε δεχτούμε ως όριο την τιμή 2 (αφού και οι ίδιοι οι συγγραφείς εκφράζουν το σκεπτικισμό τους για αυτό) μπορούμε προσεγγίζοντας συγκριτικά τα δύο συστήματα να κάνουμε κάποιες παρατηρήσεις όπως ότι πιθανά οι βιοκοινότητες του Amsterdam να εμπεριέχουν μεγαλύτερο αριθμό Archaea της ομάδας ANME-1 σε σχέση με το Kazan MV, καθώς επίσης και ότι οι βαθύτεροι ορίζοντες των ιζημάτων εμφανίζονται εμπλουτισμένοι σε ANME-1 σε σχέση με την επιφάνεια. Τις υποθέσεις αυτές θα τις εξετάσουμε ξανά παρακάτω σε συνδυασμό με δεδομένα διαφορετικών αναλύσεων.

Η χρήση των συγκεντρώσεων του λιπαρού οξέος C16:1ω5c προτείνεται ως πιο ξεκάθαρος χαρακτήρας για τη διερεύνηση της ταυτότητας των θεικοαναγωγικών βακτηριακών συντρόφων (Niemann & Elvert 2008). Στα συστήματα AMNE-2/Seep-SRB1, το C16:1ω5c βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Elvert *et al.* 2003, Blumenberg *et al.* 2004) και γίνεται το ακόμα και το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε εμπλουτισμένες καλλιέργειες (Nauhaus *et al.* 2007). Σε σχέση με το iC15 το περιεχόμενο του C16:1ω5c είναι σημαντικά μεγαλύτερο στα ANME-2/Seep-SRB1, επομένως, μικρές τιμές του λόγου, μικρότερες του 1.8 είναι ισχυρή ένδειξη οικοτύπου Seep-SRB1 που σχετίζεται με τα ANME-1.

Ωστόσο, με τη χρήση του λόγου αυτού δεν μπορούν να διαχωριστούν οι

θεικοαναγωγικοί σύντροφοι των ANME-2 και ANME-3. Η παρουσία του cyC17:0ω5,6 φαίνεται να προφέρει τις επιπλέον πληροφορίες που απαιτούνται για τη διάκριση αυτών των οικοτύπων καθώς αποδίδεται στην ομάδα συντρόφων των ANME-2 (Elvert *et al.* 2003). Επιπλέον, τα Bacteria που συσχετίζονται με τα ANME-3 φαίνεται να παράγουν υψηλές ποσότητες του λιπαρού οξέος C17:1ω6 (Niemann *et al.* 2006b).

Οι αλκυλογλυκερολοιθιές, MAGEs και DAGEs, θεωρούνται σημαντικοί βιοδείκτες των θεικοαναγωγικών Bacteria που εμπλέκονται στην AOM (Hinrichs *et al.* 2000b, Hinrichs & Boetius 2002, Elvert *et al.* 2005). Υψηλές ποσότητες MAGEs παρουσιάζονται με τον οικοτύπο Seep-SRB1 που συντροφεύουν τα ANME-2 Archaea για τη διεξαγωγή AOM καθώς και με την ομάδα των *Desulfobubulus* spp. (DBB group) που σχετίζονται με τα ANME-3 (Niemann & Elvert 2008).

Αντίθετα, υψηλές συγκεντρώσεις DAGEs λιπιδίων έχουν βρεθεί σε περιβάλλοντα όπου οι κυρίαρχοι καταναλωτές μεθανίου ανήκουν στα ANME-1 Archaea. Ωστόσο, έχουν αναγνωριστεί DAGEs που εκτός από διακλαδισμένες και ακόρεστες πλευρικές αλυσίδες (αντίστοιχων δομών με τα λιπαρά οξέα) φέρουν πλευρικές αλυσίδες με κυκλοξανικούς δακτυλίους (Pancost *et al.* 2001a, Elvert *et al.* 2005, Stadnitskaia *et al.* 2005), πρότυπο που δεν παρατηρείται στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν δημιουργήσει ερωτήματα αν, τα DAGEs λιπίδια, προέρχονται από συντροφικά θεικοαναγωγικά Bacteria ή από Bacteria που μετέχουν στην AOM με διαφορετικό βιοχημικό μονοπάτι.

Τα Amsterdam και Kazan MV φαίνεται να διαφοροποιούνται και ως προς τις τιμές των συγκεντρώσεων σε MAGEs και DAGEs.

Συγκρίνοντας την κατακόρυφη κατανομή των δύο αυτών κατηγοριών ουσιών φαίνεται συνολικά να υπερτερούν στο Kazan MV οι μονοάλκυλο-γλυκερολοιθές, MAGEs, υποδεικνύοντας την αυξημένη παρουσία των ANME-2/Seep-SRB1 συντρόφων στους ορίζοντες ιζήματος αυτού του ηφαιστείου. Ενώ, οι διάλκυλο-γλυκερολοιθές, DAGES, είχαν υψηλότερη αντιπροσώπευση στο Amsterdam MV, υποδηλώνοντας σημαντική συμβολή του συστήματος ANME-1 με αντίστοιχα συνοδά Bacteria στο οικοσύστημα των μικροοργανισμών του Amsterdam MV.

Εξετάζοντας τα λιπαρά οξέα, οι χαρακτηριστικοί βιοδείκτες C16:1ω6, C16:1ω8, C18:1ω6 και C18:1ω8, των αερόβιων μεθανιότροφων Bacteria, δεν ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα των ηφαιστείων ιλύος που εξετάστηκαν. Ωστόσο βρέθηκε σε σημαντική συγκέντρωση η 4-μεθυλοστερόλη, που επίσης έχει χαρακτηριστεί ως βιοδείκτης μεθανιοτροφίας. Στις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου (κεφάλαιο 3) βρέθηκαν λίγοι μόνο φυλότυποι που ανήκουν σε αυτή την ομάδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι αποτελούσαν πολύ μικρό ποσοστό της βακτηριακής κοινότητας.

Επίσης και άλλες ενώσεις, όπως είναι τα αβ- και ββ-αμφί-ομοσπανοϊκό οξύ [αβ- και ββ-bishomohorpanoic acid] που θεωρούνται επίσης δείκτες μεθανιοτροφίας, βρέθηκαν στα ιζήματα των ηφαιστείων ιλύος που αναλύθηκαν. Οι ενώσεις αυτές έχουν βρεθεί σε διάφορες θέσεις ψυχρών αναβλύσεων που σχετίζονται με την AOM (Elvert *et al.* 2000, Hinrichs 2001, Pancost *et al.* 2001b, Thiel *et al.* 2001, Werne *et al.* 2002, Werne *et al.* 2004, Bouloubassi *et al.* 2006) και επανειλημμένα έχουν χαρακτηριστεί βακτηριακής προέλευσης (αερόβιων θειοξιδωτικών ή μεθανιότροφων

Bacteria) με αυξημένη αφθονία στην οξυγονωμένη/ανοξική διάφαση.

Ωστόσο, η παρουσία των οπανοειδών ενώσεων σε μονίμως ανοξικά περιβάλλοντα, όπως η Μαύρη Θάλασσα αποτελεί ένδειξη παραγωγής τους από αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οπανοειδείς ενώσεις βρέθηκαν σε υποχρεωτικά αναερόβια Bacteria, όπως οι Planctomycetes (Sinninghe Damsté *et al.* 2004, Härtner *et al.* 2005). Όπως φάνηκε από τις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου, η ομάδα των Planctomycetes έχει σημαντική αντιπροσώπευση στα ιζήματα των ηφαιστείων ιλύος Amsterdam και Kazan MV και είναι πολύ πιθανό η παρουσία των οπανοειδών ενώσεων να οφείλεται σε αυτή την ομάδα καθώς οι σημαντικές ποσότητες αυτών των ενώσεων στο βαθύτερο τμήμα του πυρήνα δεν μπορούν να εξηγηθούν με άλλους μηχανισμούς.

2.4.3 Τα λιπαρά οξέα ως δείκτες περιβαλλοντικής πίεσης των Bacteria

Ο λόγος των trans προς cis λιπαρών οξέων χρησιμοποιείται ως δείκτης περιβαλλοντικού στρες, που μπορεί να είναι η χαμηλή θερμοκρασία, η υψηλή πίεση και/ή περιορισμένη διαθεσιμότητα τροφής (Guckert *et al.* 1985, Guckert *et al.* 1986, Kieft *et al.* 1994, Yano *et al.* 1998, Fang *et al.* 2004, Fang *et al.* 2006). Σε θαλάσσια ιζήματα της υποπαράλιας ζώνης ή σε ρηχούς μικροβιακούς τάπητες *Beggiatoa/Thioploca* μονάχα ίχνη μονοακόρεστων trans λιπαρών οξέων ανιχνεύονται και ο λόγος trans/cis είναι χαμηλότερος από 0.02 (Volkman *et al.* 1980, Jacq *et al.* 1989). Ωστόσο, ο λόγος αυξάνεται σε 0,09–0,30 (για το 16:1ω7) για βάθη 530–660 m στον Κόλπο του Μεξικού (Zhang *et al.* 2005, Li *et al.* 2007), σε περίπου 0,30 για βάθος 780 m στο Hydrate Ridge (Elvert *et al.* 2003), και σε

περίπου 0,50–0,73 (το C_{16:1ω5}) βάθος μεγαλύτερο από 4900 m (Guezennec & Fiala-Medioni 1996). Αυτές οι ενδείξεις υποδηλώνουν ότι η υδροστατική πίεση είναι υπεύθυνη για την αύξηση του λόγου trans/cis των μικροοργανισμών της βαθιάς θάλασσας.

Ωστόσο, αν και τα ιζήματα των ηφαιστειών ιλύος Amsterdam και Kazan που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, είχαν συλλεχθεί από μεγάλο βάθος (2000m περίπου) αυτό δε φαίνεται να αντανάκλαται στο λόγο των trans/cis λιπαρών οξέων που καταγράφηκαν. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,04 ως 0,15 για το Amsterdam MV και από 0,04 ως 0,18 για τα Kazan MV, ενώ οι τιμές για τις ρηχότερες θέσεις του Hydrate Ridge ήταν μεγαλύτερες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν όμως οι διαφορές στο λόγο trans/cis μεταξύ των διαφορετικών λιπαρών οξέων που μετρήθηκαν στο ίδιο ηφαίστειο (πχ C_{16:1ω7} και C_{18:1ω7} στο Amsterdam MV), στις διαφορές των λόγων του ίδιου οξέος μεταξύ των δύο ηφαιστειών αλλά κυρίως μεταξύ των διαφορετικών οριζόντων ιζήματος στο ίδιο ηφαίστειο. Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζουν πιθανά αντίστοιχες διαφορές στη διαθεσιμότητα των πηγών τροφής σε κάθε ορίζοντα ιζήματος ή σε κάθε ηφαίστειο αλλά και αντίστοιχη ενεργειακή ή άλλη προσαρμογή που μπορεί να υφίστανται διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών.

2.4.4 Βιοδείκτες ευκαρυωτικών οργανισμών

Οι στεροειδείς αλκοόλες αποτελούν ενώσεις βιογενούς προέλευσης και αποτελούν συστατικά των λιποπρωτεϊνών και των εξωτερικών μεμβρανών των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο κυριότερος εκπρόσωπος των C₂₇ στενολών είναι η χοληστ-5-εν-3β-όλη (χοληστερόλη), που έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ζωικούς οργανισμούς. Η

παρουσία της στα θαλάσσια ιζήματα, θεωρείται αυτόχθονης προέλευσης, με κυριότερη πηγή τους βενθικούς οργανισμούς καθώς και το ζωοπλαγκτό και το νηκτό μέσω της καθίζησης υλικού από την υπερκείμενη υδάτινη στήλη (Gagosian *et al.* 1980). Έχει ακόμα αναφερθεί ότι βιοσύνθεση C₂₇ στενολών σε Δινομαστιγωτά, Διάτομα, Πρυμνεσιόφυτα, ΚυανοBacteria και Απτόφυτα (Volkman 1986).

Ωστόσο, η παρουσία των στεροειδών αλκοολών στα ιζήματα που εξετάστηκαν δεν οφείλεται πιθανώς στο φερτό υλικό από την υπερκείμενη στήλη νερού καθώς δεν παρατηρήθηκε απόθεση πελαγικού ιζήματος πάνω από το στρώμα ιλύος των ηφαιστειών. Οι θαλάσσιοι μύκητες ως παραγωγοί των συγκεκριμένων στερολών (που βρέθηκαν σε εξαιρετικά υψηλές τιμές) πρέπει να αποκλειστούν καθώς οι χαρακτηριστικές στερόλες των μυκήτων, και κυρίως η εργοστερόλη (Charcosset & Chauvet 2001, Barajas-Aceves *et al.* 2002) δεν ανιχνεύθηκαν. Οι υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης που καταγράφηκαν είναι μάλλον αποτέλεσμα της παρουσίας βενθικών ασπονδύλων. Πυκνές βιοκοινότητες από μικρά Δίθυρα και σωληνοειδείς Πολύχαιτους έχουν ανακαλυφθεί στα ηφαίστεια ιλύος της Ανατολικής Μεσόγειου, μεταξύ των οποίων και το Kazan MV (Olu-Le Roy *et al.* 2004, Werne *et al.* 2004) καθώς και το Amsterdam MV (Perissoratis 2005).

Κελύφη και σωλήνες οργανισμών καταγράφηκαν και κατά την οπτική παρατήρηση των πυρήνων που συλλέχθηκαν για της ανάγκες της παρούσας εργασίας καθώς επίσης και στο εσωτερικό των πυρήνων (μέχρι περίπου τα πρώτα 15 cm) κατά την οριζόντια κατάτμηση αυτών πριν την εκχύλιση των λιπιδίων. Ωστόσο δεν είχαν εντοπιστεί ζώντα βενθικά ασπόνδυλα κατά την ανάκτηση των

πυρήνων γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αντίστοιχες βιοκοινότητες είχαν αναπτυχθεί σε κάποια προηγούμενη χρονική περίοδο. Οι στερεοειδείς αλκοόλες, σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα προερχόμενα από τα φωσφολιπίδια και τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αλκοολών, αποτελούν ενώσεις που μπορούν να συσσωρευτούν στο ίζημα και να παραμένουν χημικά αναλλοίωτες για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται χημικά απολιθώματα και χρησιμοποιούνται ως παλαιωκεανογραφικοί βιοδείκτες (Rosell-Melé & McClymont 2007).

Γενικά, ανάμεσα στα είδη που έχουν αναγνωρισθεί στο Kazan MV περιλαμβάνονται τα *Myrtea* sp., με την υψηλότερη αφθονία,

Lucinoma kasani, *Isorropodon perplexum* και *Idas modiolaeformis* (Von Cosel & Salas 2001, Salas & Woodside 2002, Olu-Le Roy *et al.* 2004), ενώ, έχουν βρεθεί και σκληροειδείς Πολύχαιτοι *Lamellibranchia* sp. (Olu-Le Roy *et al.* 2004).

Μελέτες βραγχίων των *Myrtea* sp. και *Vesicomys* sp., καθώς και τροφωμάτων του *Lamellibranchia* έχουν δείξει ότι αυτά αποτελούνται από βακτηριόκυτα που φιλοξενούν θειοξειδωτικά Bacteria (Fiala-Médioni & Felbeck 1990, Fisher 1995), ενώ τα βράγχια άλλων Διθύρων, όπως το *Idas modiolaeformis*, περιέχουν θειοξειδωτικούς και μεθανιότροφους συμβιώτες (Fiala-Médioni *et al.* 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η μελέτη της ποικιλότητας και της οικολογίας των μικροοργανισμών βασιζόταν, μέχρι πριν από κάποια χρόνια, μόνο στην καλλιέργεια αυτών. Τα περισσότερα θρεπτικά μέσα και οι συνθήκες καλλιέργειας δεν μπορούν να αναπαράγουν αποτελεσματικά τις φυσικές συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η μελέτη των προκαρυωτικών πληθυσμών μέσω της εφαρμογής μοριακών τεχνικών βασιζόμενων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχει οδηγήσει στην αποκάλυψη ενός μεγάλου τμήματος της μικροοργανισμικής ποικιλότητας που προηγουμένως δεν μπορούσε να απομονωθεί και ταυτοποιηθεί.

3.1.1 Το μόριο της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA ως φυλογενετικός δείκτης

Οι Zuckerkandl και Pauling το 1965 πρότειναν ότι τα μόρια μπορεί να λειτουργούν ως καταγραφείς της εξελικτικής ιστορίας καθώς και ως μοριακά χρονόμετρα (Zuckerkandl & Pauling 1965). Μερικά χρόνια αργότερα, το 1977, οι Woese και Fox αναγνώρισαν το μόριο της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA (16S rRNA για τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς) σαν ένα χρήσιμο και εξαιρετικά αποτελεσματικό εργαλείο για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων και κατασκεύασαν τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα με βάση το 16S rRNA (Woese & Fox 1977).

Το μόριο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας καθιερώθηκε ως φυλογενετικός δείκτης, λόγω των ιδιοτήτων που έχει όπως η οικουμενική του διασπορά, η προέλευσή του

μέσω της άμεσης μεταγραφής του DNA και το μέγεθος του μορίου που είναι επαρκές για τις μοριακές μεθόδους που εφαρμόζονται. Επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου που έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη συντηρητικότητας κάποιων περιοχών του μορίου (που εξασφαλίζουν διατήρηση της δευτεροταγούς δομής του μορίου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης) αλλά και τη μεταβλητότητα άλλων περιοχών του μορίου, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακά χρονόμετρα (Madigan *et al.* 2008).

Σήμερα στις βάσεις δεδομένων των αλληλουχιών έχουν κατατεθεί εκατομμύρια αλληλουχιών που αντιστοιχούν στο 16S rRNA μικροοργανισμών τόσο από αμιγείς καλλιέργειες μικροοργανισμών όσο και από ανάλυση κοινοτήτων μικροοργανισμών από περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτές οι βάσεις δεδομένων είναι προσβάσιμες μέσω διαδικτύου, επιτρέποντας έτσι την εύκολη, σχετικά, ταυτοποίηση των μελετώμενων μικροοργανισμών.

3.1.2 Φυλογενετική ανάλυση

Η μεθοδολογία του χαρακτηρισμού των μικροοργανισμών ενός ενδιαίτηματος μέσω της κατασκευής βιβλιοθηκών κλώνων του 16S rRNA γονιδίου, ξεκινάει με την απομόνωση από το εξεταζόμενο ενδιαίτημα του συνολικού DNA της κοινότητας των μικροοργανισμών. Το ανακτώμενο DNA είναι μείγμα γονιδιωματικού DNA όλων των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο ενδιαίτημα και από το μείγμα αυτό μέσω της PCR αντιγράφονται τα επιθυμητά γονίδια-στόχοι και παράγεται επαρκής αριθμός αντιγράφων τους για περαιτέρω ανάλυση. Το

κάθε αντίγραφο εισάγεται σε ένα φορέα, δημιουργώντας ένα πλασμίδιο. Το μείγμα των πλασμιδίων (που το καθένα φέρει ως ένθεμα το γονίδιο ενός από τους μικροοργανισμούς που υπήρχαν στο μελετώμενο ενδιαίτημα) χρησιμοποιείται για το μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων, μέσω των οποίων καθίσταται η αλληλούχιση του ενθέματος και ο πλήρης προσδιορισμός της αλληλουχίας του.

Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί αλγόριθμοι ανάλυσης αλληλουχιών και δημιουργίας φυλογενετικών δέντρων διαθέσιμοι για τη συγκριτική εξέταση του ριβοσωμικού RNA. Ωστόσο, ανεξάρτητα από το λογισμικό που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου, οι αλληλουχίες πριν από την επεξεργασία πρέπει να στοιχιστούν με τη χρήση ενός ευθυγραμιστή αλληλουχιών. Οι στοιχημένες αλληλουχίες εισάγονται κατόπιν στο καθαυτό πρόγραμμα προσδιορισμού διακλαδώσεων και γίνονται οι συγκριτικές αναλύσεις. Δύο αλγόριθμοι ευρείας εφαρμογής είναι οι «απόσταση» [distance] και «φειδώ» [parsimony]. Με την εφαρμογή μεθόδων «απόστασης», οι αλληλουχίες αντιστοιχίζονται και ο υπολογιστής μετρά κάθε δυνατή θέση στα δεδομένα στην οποία υπάρχει διαφορά, για να υπολογίσει μια εξελικτική απόσταση [Evolutionary Distance, E_D]. Από τα δεδομένα αυτά, μπορεί να κατασκευαστεί ένας πίνακας που δείχνει την εξελικτική απόσταση μεταξύ οποιουδήποτε ζεύγους αλληλουχιών στο σύνολο των δεδομένων. Μετά από αυτό, εισάγεται ένας διορθωτικός παράγοντας, ο οποίος συνυπολογίζει την πιθανότητα να έχουν συμβεί πολλαπλές αλλαγές σε ένα συγκεκριμένο σημείο. Τέλος, κατασκευάζεται ένα φυλογενετικό δένδρο στο οποίο οι αποστάσεις των γραμμών είναι ανάλογες των εξελικτικών αποστάσεων (Nei & Kumar 2000, Hall 2001, Nei 2006).

Ο αλγόριθμος «φειδώ», μια άλλη δημοφιλής μέθοδος φυλογενετικής ανάλυσης, δημιουργεί φυλογενετικά δένδρα βασισμένους στην παραδοχή ότι για την απόκλιση δύο απογόνων, προερχόμενων από έναν κοινό πρόγονο, έχει συμβεί μόνον ο ελάχιστος αριθμός μεταβολών στις αλληλουχίες. Στη μέθοδο αυτή απαιτείται, επίσης, να γίνει σύνοψη του αριθμού των διαφορών που υπάρχουν στις αλληλουχίες σε ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων, όμως ο αλγόριθμος εφαρμόζει μια κάπως διαφορετική ανάλυση. Παρ' όλα αυτά, τα φυλογενετικά δέντρα που στηρίζονται στον αλγόριθμο «φειδώ» εμφανίζονται όμοια με τα δέντρα «απόστασης», αν και η διάταξη των κλάδων ενδέχεται να διαφέρει. Πράγματι αυτό συμβαίνει σε δέντρα προερχόμενα από τους δύο αλγορίθμους οι οποίοι έχουν εφαρμοσθεί σε πανομοιότυπα σύνολα δεδομένων. Κανένα συγκεκριμένο φυλογενετικό δέντρο δεν μπορεί να δώσει την «οριστική απάντηση» στις εξελικτικές σχέσεις των οργανισμών που εξετάζονται. Αυτό που επιτυγχάνεται όμως με τα φυλογενετικά δέντρα είναι μια κατά το δυνατόν πιστή προσέγγιση της φυλογένεσης (Nei & Kumar 2000, Hall 2001, Nei 2006).

Η μελέτη της φυλογένεσης είναι αναπόσπαστο κομμάτι της οικολογίας των προκαρυωτικών οργανισμών. λόγω κυρίως των προβλημάτων ορισμού και προσδιορισμού του μικροβιακού είδους. Η κλασική ταξινομία των προκαρυωτικών μικροοργανισμών στηρίζεται παραδοσιακά σε φαινοτυπικές αναλύσεις, που εξετάζουν τα χαρακτηριστικά ενός μικροοργανισμού, τον ενεργειακό μεταβολισμό του, τα ένζυμά του κλπ. Ωστόσο, επειδή υπάρχει αδυναμία στην απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια των περισσότερων μικροοργανισμών αλλά επειδή υπάρχει σημαντική φαινοτυπική ομοιότητα πολλών

μικροοργανισμών που μπορεί να ανήκουν σε πολύ διαφορετικές ομάδες, η ταξινομία βασίζεται στη μελέτη της φυλογένεσης και προκύπτει από γονοτυπικές αναλύσεις (Madigan *et al.* 2008).

Στις μελέτες οικολογίας των μικροοργανισμών αποφεύγεται η χρήση του όρου είδους (Ogunseitán 2007, Madigan *et al.* 2008). Αντί αυτού χρησιμοποιούνται οι όροι Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα [Operational Taxonomic Unit, OTU] ή φυλότυπος [rhylotype].

Για τη μελέτη των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αναερόβια οξείδωση του μεθανίου και τη μεθανιογένεση σε ιζήματα μεθανιοϋδριτών της Ανατολικής Μεσογείου κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA από δύο υποθαλάσσια ηφαίστεια της περιοχής, που κατά τη διάρκεια των ερευνών βρέθηκαν να περιέχουν μεθανιοϋδρίτες, το Amsterdam MV και το Kazan MV.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Δειγματοληψία

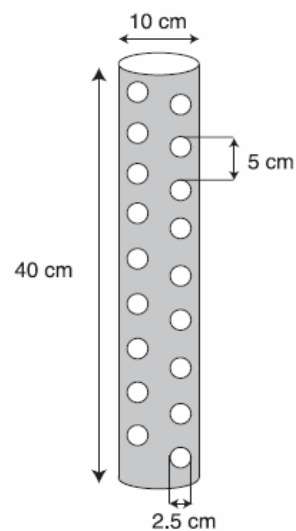
Δείγματα ιλύος που έφεραν μεθανιοϋδρίτες συλλέχθηκαν από τα Amsterdam MV (35° 20' 02" N, 30° 16' 18" E, 2030m) και Kazan MV (35° 25' 55" N, 30° 33' 42" E 1700m), υποθαλάσσια ηφαίστεια που βρίσκονται στο πεδίο των Ορέων του Αναξίμανδρου στην Ανατολική Μεσόγειο με το Ω/Κ Αιγαίο το Μάιο του 2003. Κυλινδρικοί πυρήνες «ώσης» εφαρμόστηκαν για τη λήψη ιζήματος που είχε συλλεχθεί μέσω κυβωτιοπυρηνολήπτη τύπου Eckmann (0,16m²).

Για τη σύγχρονη λήψη υποδειγμάτων για γεωχημική και μικροβιολογική εργασία υψηλής κατακόρυφης ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε πλαστικός δειγματολήπτης στον οποίο είχαν γίνει δύο παρακείμενες οπές (διαμέτρου περίπου 2,5cm) σε διαστήματα 5cm (Εικόνα 3.1). Οι οπές είχαν καλυφθεί με

πλαστική ταινία κατά τη διάρκεια της πυρηνοληψίας. Για τη λήψη του ιζήματος η ταινία αφαιρέθηκε σταδιακά και σε κάθε ζευγάρι οπών τοποθετήθηκαν σύριγγες των 50ml (από τις οποίες είχε αποκοπεί το στόμιο, ήταν δηλαδή ανοιχτές στο κάτω μέρος).

Στη συνέχεια οι σύριγγες αφαιρέθηκαν με προσοχή και το ιζήμα μεταφέρθηκε σε πλαστικούς σωλήνες τύπου Falcon 50ml, που αποθηκεύθηκαν αμέσως στους -20°C, όπου και διατηρήθηκαν σε όλη τη διάρκεια του πλόα. Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

Το εγγύτερο στην επιφάνεια δείγμα, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 3.1, δεν περιλάμβανε τα πρώτα μερικά χιλιοστά του ιζήματος.



Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση του πυρήνα που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτόχρονη λήψη ιζήματος (από Kormas *et al.* 2008)

3.2.2 Εκχύλιση DNA

Έγινε εκχύλιση DNA από ~1g νωπού ιζήματος όλων υποδειγμάτων με τη χρήση του Ultra Clean Soil DNA kit (MoBio, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και την

εκδοχή αυτού για μέγιστη απόδοση [“for maximum yield”].

3.2.3 Ενίσχυση 16S rRNA γονιδίου, Κλωνοποίηση, Φυλογενετική Ανάλυση

Για τη βέλτιστη ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών [primers], ποικίλος αριθμός κύκλων ενίσχυσης και διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικής ποσότητας μήτρας DNA. Τελικά σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα 0,5 μl, από το DNA που είχε εκχυλιστεί, με τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Τα διαλύματα της αντίδρασης περιείχαν 1x ρυθμιστικού διαλύματος High Yield Reaction Buffer (KapaBiosystems, USA), διάλυμα τριφωσφωρικών δεοξυνουκλεοσιδίων (200μM για κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 pmol/μl από τον κάθε εκκινητή και 0,4 U πολυμεράσης KAPATaq DNA (KapaBiosystems, USA). Για την κατασκευή βιβλιοθήκης βακτηριακών κλώνων επιλέχθηκε τελικά ο συνδυασμός εκκινητών BAC-8f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') και BAC-1390r (5' GACGGGCGGTGTGTACA 3') (Lane 1991). Οι αντίστοιχοι εκκινητές για τα Archaea ήταν ARC-8f (5' TCCGGTTGATCCTGCC 3') και ARC-1490r (5' GGCTACCTTGTTACGACTT 3') (Teske *et al.* 2002). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ίδιες και για τα δύο ζεύγη εκκινητών και περιλάμβαναν, έναν αρχικό κύκλο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2min, ακολουθούμενος από ένα αριθμό επαναλαμβανόμενων κύκλων στους 95 °C για 45sec, στους 52,5 °C για 45sec και στους 72 °C για 1min 30sec. Εφαρμοζόταν και ένα τελικό στάδιο όπου γινόταν επιμήκυνση των αντιγράφων στους 72 °C για 10 min. Τα προϊόντα της PCR ελέγχονταν για την ορθότητα του μεγέθους τους και την καθαρότητά τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0% με μάρτυρα, GeneRuler 100bp DNA ladder plus

Ο αριθμός των κύκλων για κάθε δείγμα καθοριζόταν μετά από βελτιστοποίηση των κύκλων της αντίδρασης. Συνοπτικά πανομοιότυπες αντιδράσεις επαναλήφθηκαν με διαφορετικό αριθμό κύκλων και ο μικρότερος αριθμός κύκλος που έδωσε καθαρό, ορθό προϊόν χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποίηση και αηλουόχηση για να αποφευχθεί η διαφορετική αντιπροσώπευση των 16S rRNA γονιδίων μεγάλου και μικρού αριθμού αντιγράφων (Spiegelman *et al.* 2005). Ο αριθμός των κύκλων που εφαρμόστηκε κυμάνθηκε από 27 ως 30 για τις βιβλιοθήκες κλώνων των Archaea και από 29 ως 31 για τις βιβλιοθήκες κλώνων των Bacteria.

Οχτώ αντιδράσεις από κάθε δείγμα συνενώθηκαν και ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με χρήση του Montage kit (Millipore, USA) και κλωνοποίηση με τη χρήση του TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, USA) σε ηλεκτροδεκτικά κύτταρα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επιστροφή των μετασχηματισμένων Bacteria έγινε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Luria Bertani¹⁰ και μέσο επιλογής¹¹. Έγινε επώαση για 16-18 ώρες στους 37°C.

Η επιλογή των κλώνων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με το επιθυμητό προϊόν (ένθεμα) έγινε με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση των ειδικών για το πλασμίδιο εκκινητών M13f (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') και M13r (5' CAGGAAACAGCTAGAC 3') και έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0%. Οι κλώνοι που είχαν ένθεμα με το αναμενόμενο μέγεθος καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Luria Bertani με καναμυκίνη για 16-18 ώρες στους 37°C σε ανακινούμενο επωαστήρα. Ακολούθησε η απομόνωση των

¹⁰ 1.0% Τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1.0% NaCl, pH 7.0 και 15g l⁻¹ άγαρ

¹¹ αντιβιοτικό καναμυκίνη, 50μg ml⁻¹

πλασμιδίων με το kit NucleoSpin Plasmid Purification (Macherey Nagel, Germany). Τα απομονωμένα πλασμίδια στάλθηκαν για προσδιορισμό αλληλούχισης του ενθέματος (Macrogen, Korea).

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ελέγχθηκαν για λάθη (μεγάλος αριθμός αμφίβωλων βάσεων, φτωχή αλληλοεπικάλυψη μιας αλληλουχίας και της συμπληρωματικής της) και την ύπαρξη χιμαιρικών αλληλουχιών¹² με τη χρήση του λογισμικού Bellerophon από τη GreenGene (DeSantis *et al.* 2006) μέσω του διαδικτυακού τόπου http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi. Όσες παρουσίασαν λάθη απορρίφθηκαν ενώ οι υπόλοιπες τοποθετήθηκαν σε ένα αρχείο υπό μορφή FASTA για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Αρχικά συγκρίνεται η επί τοις εκατό ομοιότητα των αλληλουχιών και η κατάταξή τους σε ομάδες ομοιότητας με βάση το πρόγραμμα Clustalw (Thompson *et al.* 1994), και τη δικτυακή εκδοχή αυτού από την ιστοσελίδα <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Αλληλουχίες, για το 16S rRNA γονίδιο, που δείχνουν ομοιότητα μεγαλύτερη ή ίση με το 98% θεωρούνται ότι ανήκουν στον ίδιο φυλότυπο.

Έγινε σύγκριση των αλληλουχιών μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST [Basic

¹² χιμαιρική ονομάζεται μία αλληλουχία που αποτελείται από δύο ή περισσότερες φυλογενετικά διακριτές πατρικές αλληλουχίες. Πρόκειται για κατασκευάσμα της PCR που δημιουργείται όταν ένα αντίγραφο που τερματίστηκε πρόωρα επαναπροσδένεται σε διαφορετική πατρική αλληλουχία και επιμηκύνεται στους επόμενους κύκλους της αντίδρασης. Είναι ένα φαινόμενο που παρτηρείται συχνά, όταν η μήτρα DNA που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλάσιασμό είναι μίγμα γονιδιωμάτων, όπως είναι τα περιβαλλοντικά δείγματα (Suzuki & Giovannoni 1996, Wintzingerode *et al.* 1997).

Local Alignment Tool] (Altschul *et al.* 1990) στην ιστοσελίδα <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, με αλληλουχίες που είναι ήδη κατατεθειμένες σε διεθνή τράπεζα δεδομένων για την ταυτοποίησή τους και βρέθηκαν οι κοντινότεροι συγγενείς με βάση την πρωτοταγή δομή των γονιδίων. Ακολούθησε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με τους ήδη γνωστούς συγγενείς και κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων με το πρόγραμμα MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007), τη μέθοδο αποστάσεων Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987) και τη χρήση του μοντέλου Kimura-2p (Kimura 1980). Οι κόμβοι του δέντρου και η στατιστική εγκυρότητα του δέντρου ελέγχθηκαν με τη μέθοδο bootstrap (Felsenstein 1985).

3.2.4 «Κάλυψη» των βιβλιοθηκών κλώνων

Για τον έλεγχο της πληρότητας των βιβλιοθηκών που κατασκευάστηκαν, εφαρμόστηκε μέθοδος που χρησιμοποιεί αλγόριθμο συσχέτισμού των κλώνων που εξετάζονται και των φυλοτύπων που απαντώνται. Ο εκτιμητής κάλυψης Good's [C-Good's coverage] είναι ένας μη παραμετρικός δείκτης του ποσοστού των φυλοτύπων μιας βιβλιοθήκης απεριόριστου μεγέθους που θα αντιπροσωπευόταν σε μία μικρότερη βιβλιοθήκη και εκφράζει το πόσο αντιπροσωπευτικό είναι το δείγμα του πληθυσμού σε σχέση με το σύνολο του ενδιαφέροντος απ' όπου ελήφθη. Ο εκτιμητής αυτός (Good 1953) υπολογίζεται από το μαθηματικό τύπο $C = 1 - n_1/N$ όπου n_1 είναι ο αριθμός των φυλοτύπων που παρουσιάζονται μία φορά στη βιβλιοθήκη και N το μέγεθος της βιβλιοθήκης. Η στατιστική αυτή ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της ιστοσελίδας <http://aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html> (Kemp & Aller 2004).

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι κωδικές ονομασίες των κλώνων που χρησιμοποιούνται επιλέχθηκαν ώστε να υποδεικνύουν τη βιβλιοθήκη κλώνων από την οποία προήλθαν. Οι κωδικοί ξεκινάνε με πέντε γράμματα που αντιπροσωπεύουν το υποθαλάσσιο ηφαίστειο από το οποίο έγινε η δειγματοληψία και είναι **AMSMV** και **KZNMV** για το Amsterdam MV και το Kazan MV, αντίστοιχα. Ακολουθεί αριθμός ενδεικτικός του βάθους του ιζήματος το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή της βιβλιοθήκης **0, 5, 10, 15, 20, 25, 30** cmbsf. Ο χαρακτήρας **A** ή **B** υποδεικνύει βιβλιοθήκη κλώνων 16S rRNA γονιδίου από Archaea ή Bacteria.

Τα δεδομένα για τη ζώνη ιζήματος στα 15 και 20 cmbsf δεν αποτελούν πειραματικό αποτέλεσμα αυτής της εργασίας και για το λόγο αυτό δε θα παρουσιαστούν αναλυτικά στα αποτελέσματα. Αντλήθηκαν από τη δημοσίευση των Kormas *et al.* (2008) και χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκριτική μελέτη της σύστασης των προκαρυωτικών βιοκοινοτήτων κατά μήκος του πυρήνα ιζήματος του Kazan MV.

Ο εκτιμητής κάλυψης Good's C (Σχήμα 3.9 και Σχήμα 3.10) κυμάνθηκε από 0,8 ως 1,0 για τις βιβλιοθήκες κλώνων των Archaea και από 0,4 ως 0,8 για τις βιβλιοθήκες κλώνων των Bacteria.

3.3.1 Amsterdam MV

3.3.1.1 Archaea

Αλληλουχήθηκαν 291 κλώνοι, οι οποίοι μετά την εφαρμογή του κριτηρίου ομοιότητας $\geq 98\%$ ομαδοποιήθηκαν σε 43 φυλοτύπους. Η συντριπτική πλειοψηφία των φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν ($>97\%$ των κλώνων που αλληλουχήθηκαν) ανήκουν σε ομάδες των Euryarchaeota (Σχήμα 3.1 και 3.2). Το επιφανειακό δείγμα, αν και έδωσε προϊόν στην

PCR δεν οδήγησε σε επιτυχημένη κλωνοποίηση και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα για το δείγμα αυτό. Φυλοτύποι που ανήκουν στα ANME-1 βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά σε όλες βιβλιοθήκες, εκτός από αυτή που κατασκευάστηκε από τον ορίζοντα τον 30 cmbsf. Βρέθηκαν να κυριαρχούν στον ορίζοντα των 10 cmbsf, όπου ένας φυλοτύπος, ο AMSMV-10-A33, αποτέλεσε το 54,6% των κλώνων που αλληλουχήθηκαν σε αυτή τη βιβλιοθήκη. Ο ίδιος φυλοτύπος AMSMV-15-A8 επικράτησε (45,5%) στον ορίζοντα τον 15 cmbsf. Συνεπικράτησε στον ορίζοντα των 20 cmbsf (AMSMV-20-A12, 32,8%) μαζί με το φυλοτύπο AMSMV-20-2 (31,0%) που ανήκει στην υποομάδα των ANME-2a,b, καθώς και στο βάθος των 25 cmbsf (AMSMV-25-A21, 41,3%) με τον AMSMV-25-A2 (39,1%) που ανήκει στα ANME-2c. Εμφανίστηκε, δε και στα 5 cmbsf, AMSMV-5 (11,8%).

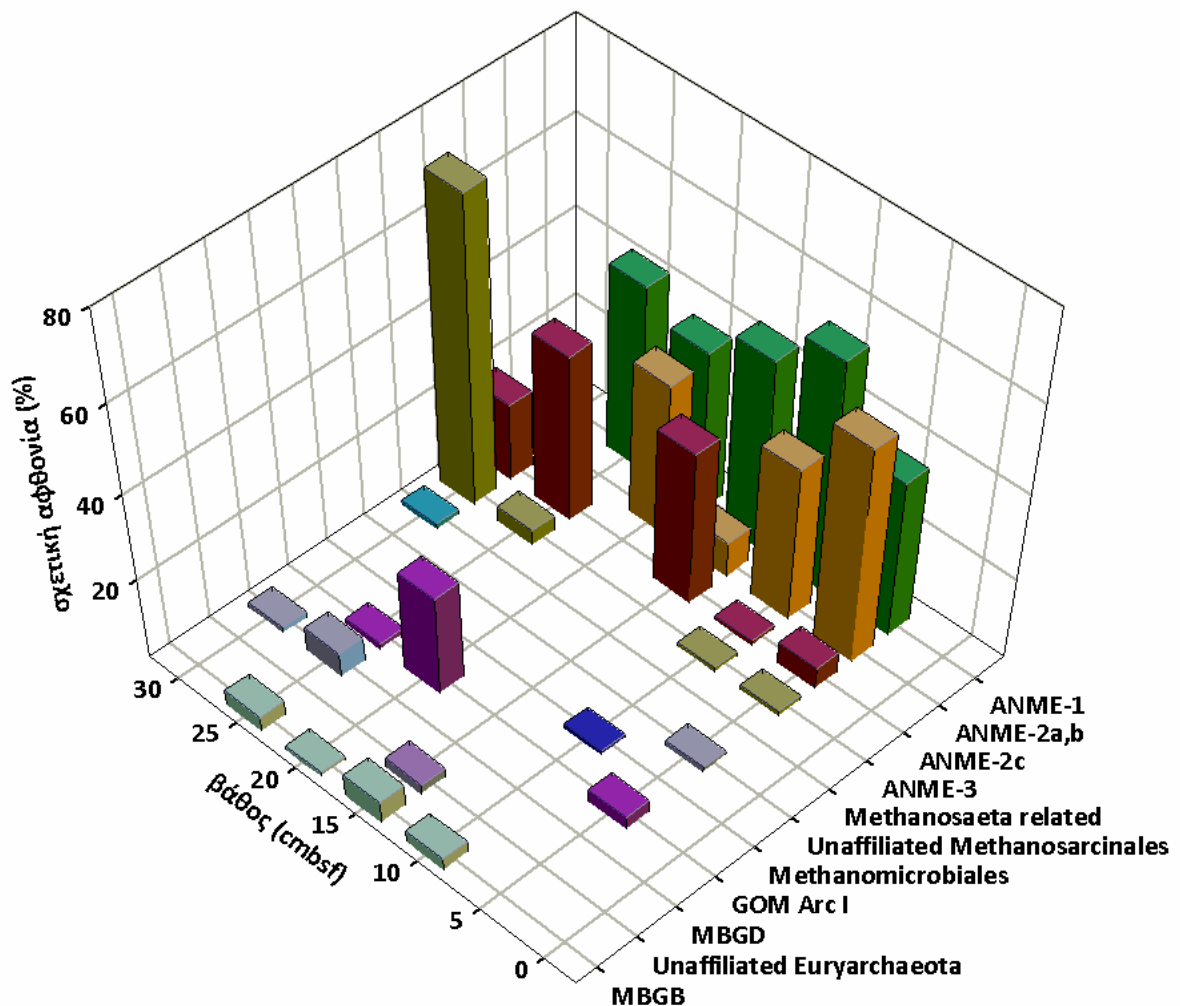
Στα 5 cmbsf παρουσιάστηκαν δύο ακόμα φυλοτύποι που ανήκουν στα ANME-1, ο AMSMV-5-A2 (23,5%) και ο AMSMV-5-A30 (2,0%). Κυριάρχησαν ωστόσο, σε αυτό το βάθος τα ANME-2, και συγκεκριμένα η υποομάδα ANME-2a,b, με δύο φυλοτύπους AMSMV-5-A3 (31,4%) και AMSMV-5-A7 (19,6%).

Η ίδια υποομάδα παρουσιάστηκε με υψηλό ποσοστό στα 20 cmbsf. Αντιπροσωπεύεται από τους φυλοτύπους AMSMV-20-A2 (31,0%) και AMSMV-20-A32 (5,2%). Στο ίδιο βάθος εμφανίστηκε αυξημένη παρουσία της ομάδας, GoM Arc I [Gulf of Mexico Archaea I, ομάδα που χαρακτηρίστηκε και ονομάστηκε από τους Lloyd *et al.* (2006)] με ποσοστό 24,1%. Ο ορίζοντας των 30 cmbsf παρουσίασε εντελώς διαφορετική σύσταση βιοκοινοτήτων όσον αφορά τα Archaea. Επικράτησε με πολύ υψηλό ποσοστό (70,8%), ο φυλοτύπος AMSMV-30-A2, ο οποίος ομαδοποιήθηκε στα ANME-3 Archaea. Ο

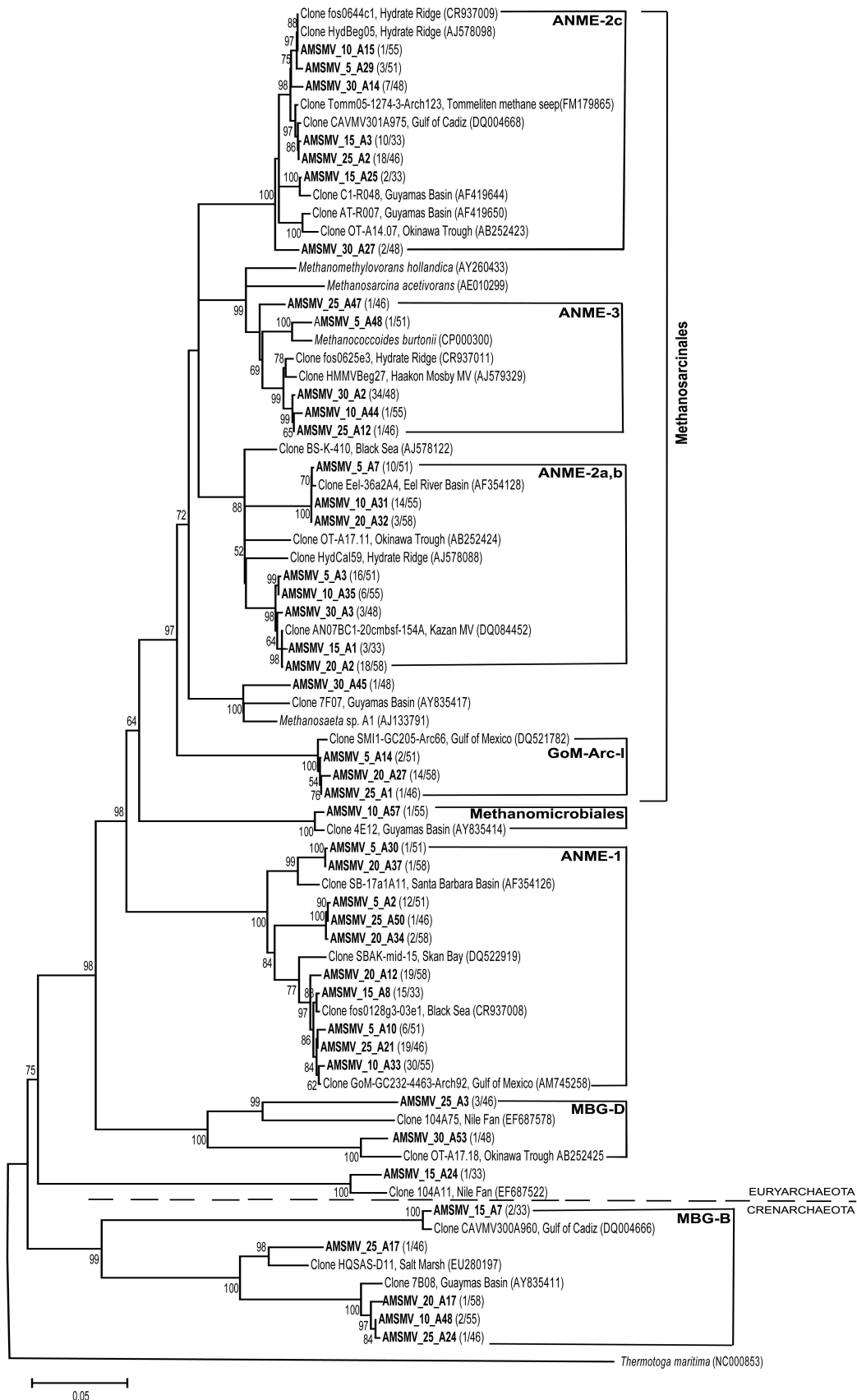
φυλότυπος αυτός ανιχνεύθηκε και στις βιβλιοθήκες κλώνων από τα 10 (AMSMV-10-A44) και 25 cmbsf (AMSMV-25-A12) σε μικρό όμως ποσοστό ~2%.

Βρέθηκαν επίσης φυλότυποι που ανήκουν στη Θαλάσσια Βενθική Ομάδα D [Marine Benthic Group-D, MBG-D, ομάδα που χαρακτηρίστηκε και ονομάστηκε από τους Vertiani *et al.* (1999)] των Euryarchaeota στον ορίζοντα των 25 cmbsf (AMSMV-25-A3, 6,5%) και στον ορίζοντα των 30 cmbsf (AMSMV-30-

A53, 2,1%). Φυλότυποι που κατατάχθηκαν στα Crenarchaeota, στη Θαλάσσια Βενθική Ομάδα B [Marine Benthic Group B, MBG-B, ομάδα που χαρακτηρίστηκε και ονομάστηκε από τους Vertiani *et al.* (1999)], ταυτοποιήθηκαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων των 10 cmbsf (AMSMV-10-A48, 3,6%), των 15 cmbsf (AMSMV-15-A7, 6,1%), των 20 cmbsf (AMSMV-20-A17, 1,7%) και των 25 cmbsf (AMSMV-25-A17 και AMSMV-25-A24, 4,4%).



Σχήμα 3.1 Σχετική αφθονία των φυλογενετικών ομάδων στις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Archaea σε ίζημα ιλύος του Amstervedam MV

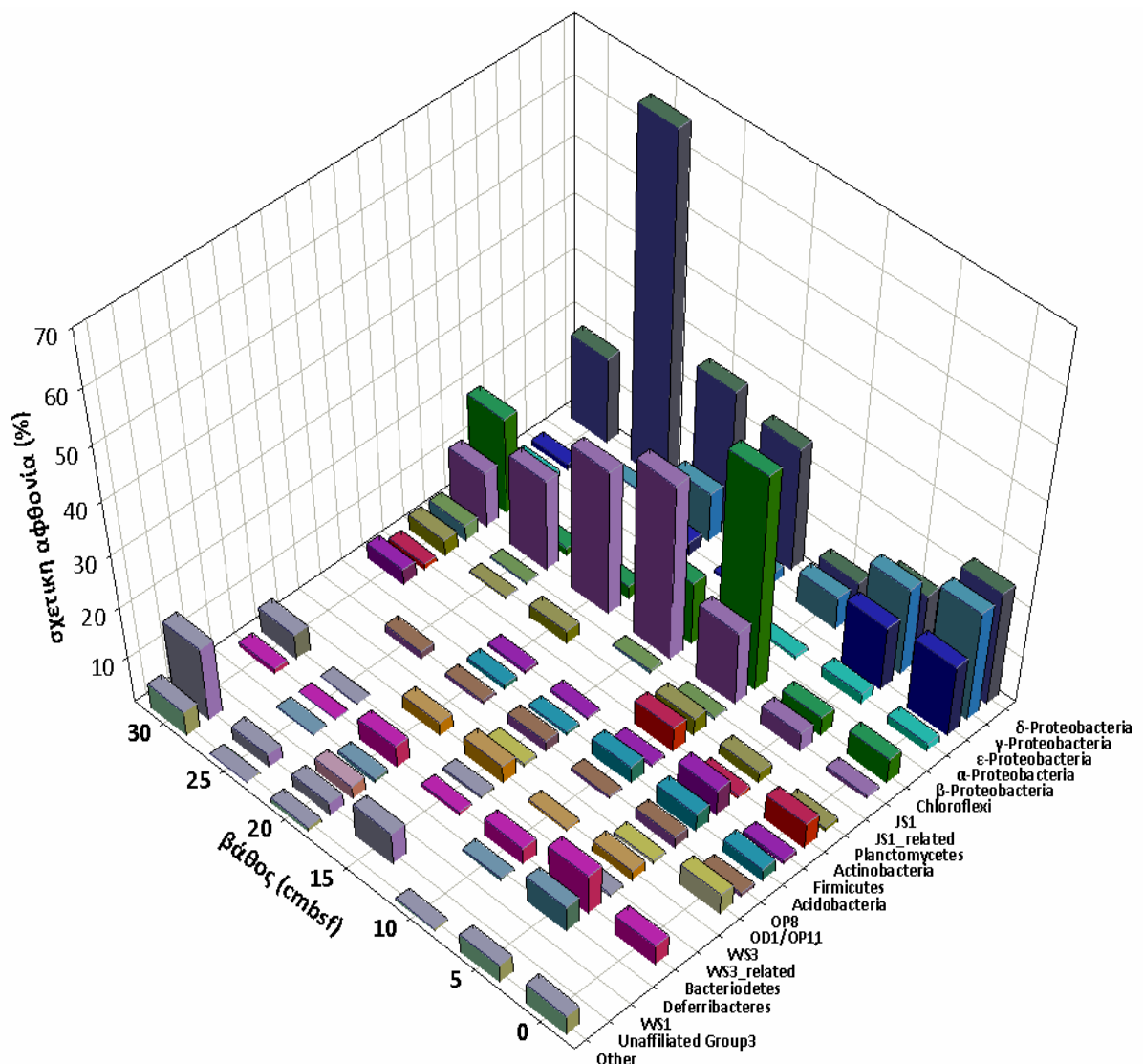


Σχήμα 3.2 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φυλοτύπων (ca. 1400 bp) των Archaea από ίζημα ιλύος του Amsterdam MV, βασισμένο στον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση αποστάσεων Kimura-2p. Οι κωδικοί των φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν (έντονα γράμματα) σηματοδοτούν το βάθος προέλευσης του δείγματος. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών ($\geq 98\%$ ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις. Χίλιες επαναλήψεις bootstrap έλαβαν χώρα και τα ποσοστά μεγαλύτερα του 50% εμφανίζονται στους κόμβους των κλάδων. Οι αριθμοί στις αγκύλες είναι οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση δεδομένων GenBank. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 5% εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση.

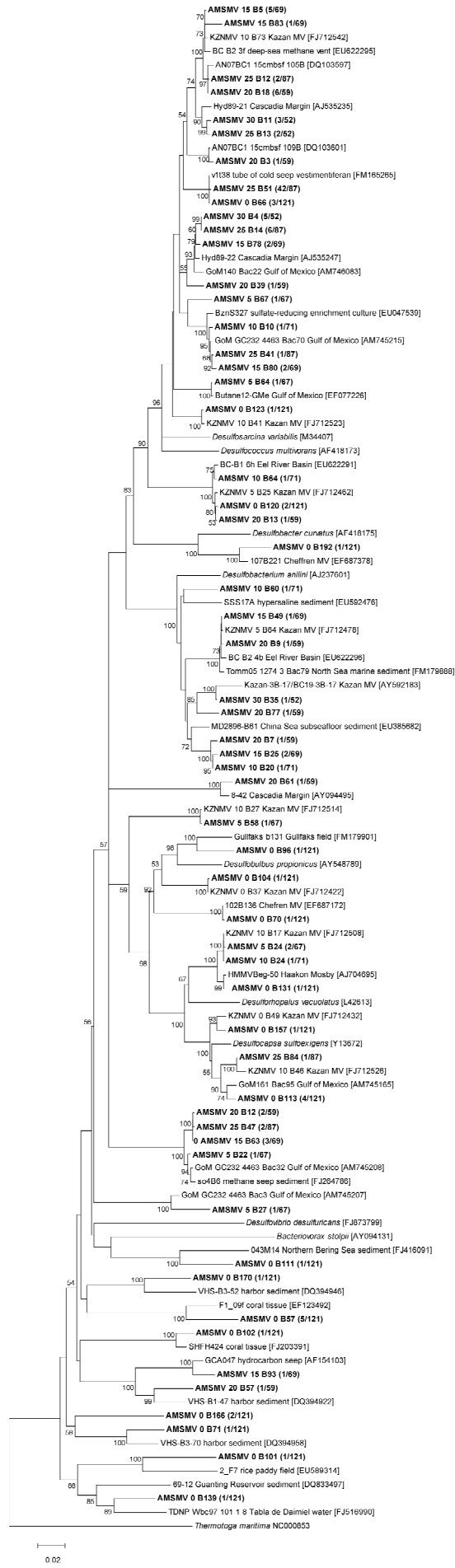
3.3.1.2 Bacteria

Αναλύθηκαν 526 κλώνοι του 16S rRNA γονιδίου των Bacteria και ομαδοποιήθηκαν σε 275 φυλοτύπους. Η πλειοψηφία των κλώνων που αναλύθηκαν βρέθηκε ότι ανήκουν στο φύλο των Proteobacteria, ενώ οι υπόλοιποι φυλότυποι σχετίστηκαν: με τα φύλα Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Deferribacteres, Firmicutes, OP5, Planctomycetes, Spirochaetes,

Verrucomicrobia, τα υποψήφια φύλα JS1 (Webster *et al.* 2004), OD1/OP11 (Hugenholtz *et al.* 1998b, Harris *et al.* 2004), OP8 (Hugenholtz *et al.* 1998b), TM6 (Rheims *et al.* 1996), WS1 (Zhou *et al.* 1997), WS3 (Dojka *et al.* 1998), WS6 (Dojka *et al.* 1998), WWE (Chouari *et al.* 2005), την ομάδα Desulfurella Group (Burton & Norris 2000) και έξι ομάδες που δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα (Σχήμα 3.3, Σχήμα 3.4 και Πίνακας 3.1).

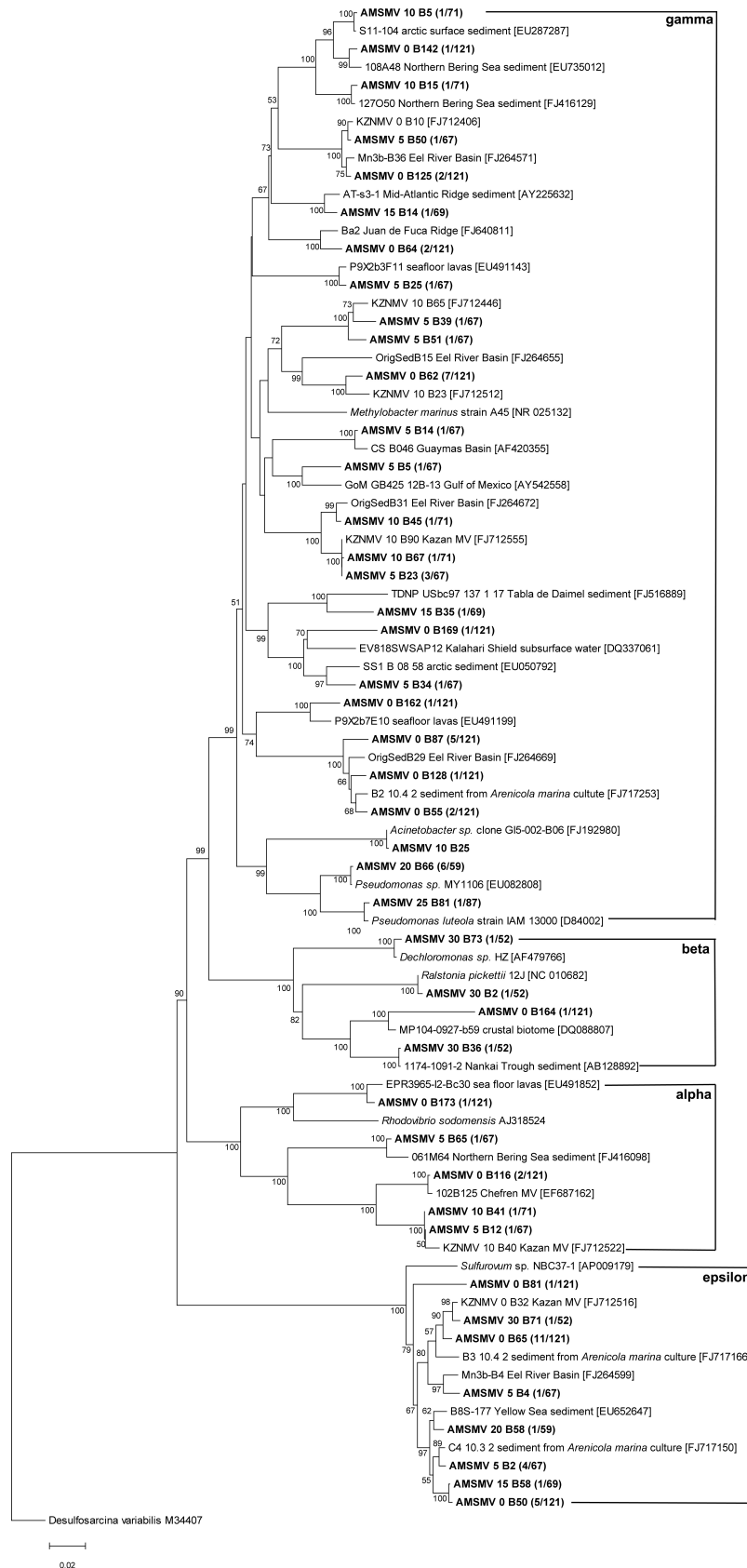


Σχήμα 3.3 Σχετική αφθονία των φυλογενετικών ομάδων στις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Bacteria σε ίζημα ιλύος του Amstcrdam MV. Παρουσιάζονται μόνο οι φυλογενετικές ομάδες που έχουν ποσοστό $\geq 2\%$ σε μία τουλάχιστον από τις βιβλιοθήκες. Τα ποσοστά των υπόλοιπων ομάδων (παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 3.1) έχουν αθροιστεί και περιλαμβάνονται Other.



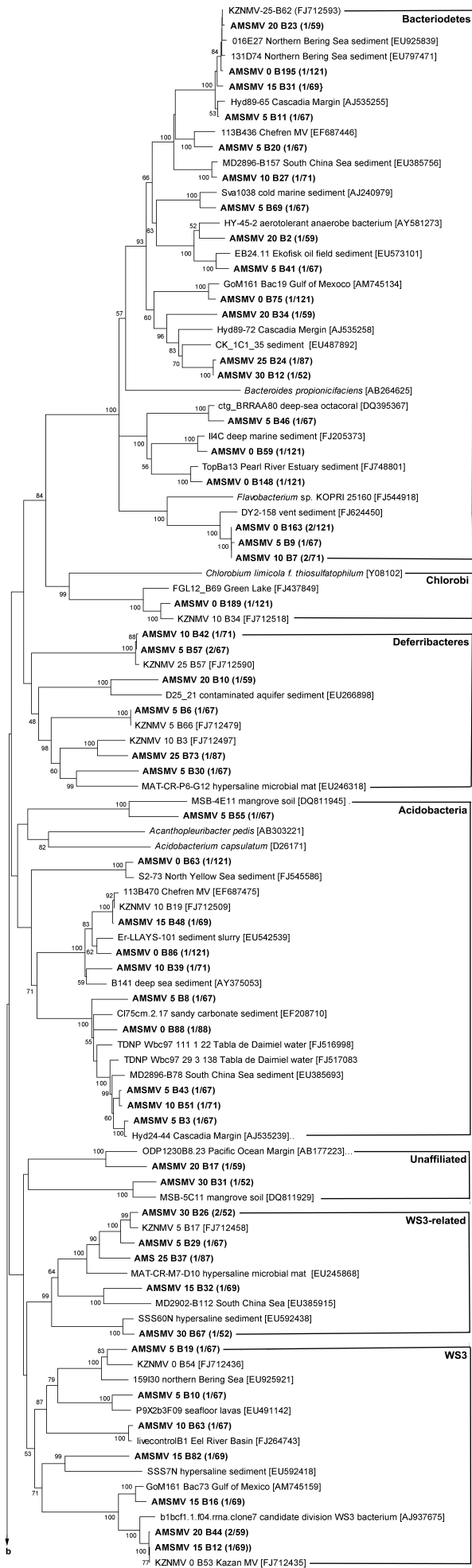
0.02

a

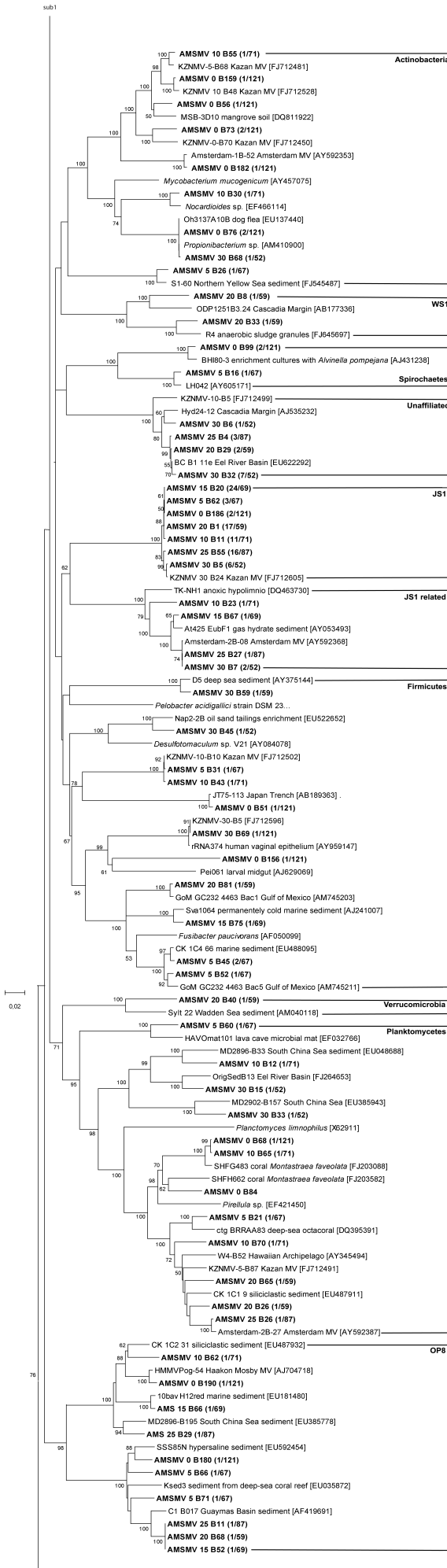


b

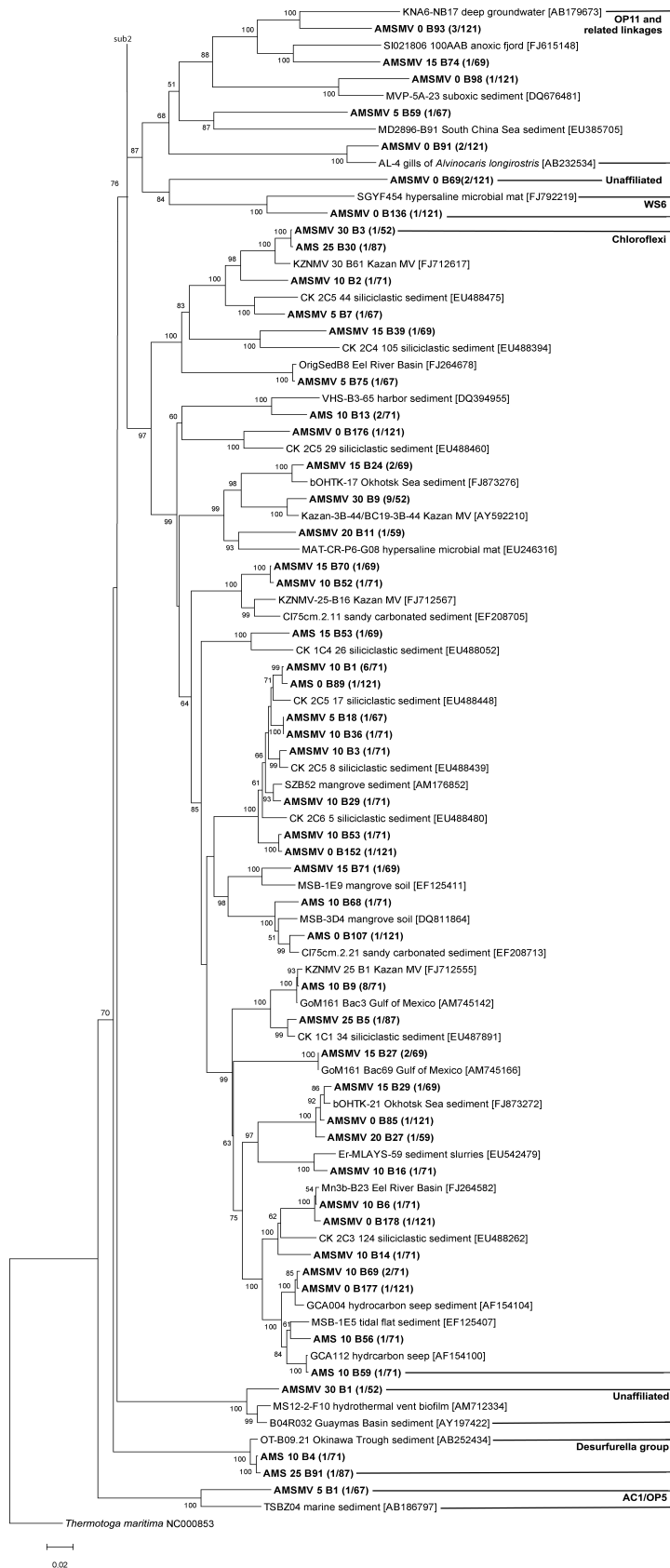
Σχήμα 3.4 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φυλοτύπων (ca. 1400 bp) των δ-Proteobacteria (a) και των υπόλοιπων Proteobacteria (b) από ίζημα ιλύος του Amsterdam MV, βασισμένο στον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση αποστάσεων Kimura-2p. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών (≥98% ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις. Χίλιες επαναλήψεις bootstrap έλαβαν χώρα και τα ποσοστά μεγαλύτερα του 50 εμφανίζονται στους κόμβους των κλάδων. Οι αριθμοί στις αγκύλες είναι οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση δεδομένων GenBank. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 5% εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση.



a



b



C

Σχήμα 3.5 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φυλοτύπων (ca. 1400 bp) των Bacteria (δεν περιλαμβάνονται τα Proteobacteria) από ίζημα ιλύος του Amsterdam MV, βασισμένο στον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση αποστάσεων Kimura-2p. Οι κωδικοί των φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν (έντονα γράμματα) σηματοδοτούν το βάθος προέλευσης του δείγματος. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών ($\geq 98\%$ ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις. Χίλιες επαναλήψεις bootstrap έλαβαν χώρα και τα ποσοστά μεγαλύτερα του 50% εμφανίζονται στους κόμβους των κλάδων. Οι αριθμοί στις αγκύλες είναι οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση δεδομένων GenBank. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 5% εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση.

Πίνακας 3.1 Φυλογενετική ομαδοποίηση και σχετική αφθονία (σε ποσοστό %) των φυλοτύπων που προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων 16S RNA γονιδίου των ιζημάτων του Amsterdam MV. Με εσκίαση και έντονη γραφή παρουσιάζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά της κάθε βιβλιοθήκης ενώ με έντονη γραφή χωρίς σκίαση παρουσιάζονται τα δεύτερα επικρατέστερα

	0	5	10	15	20	25	30
	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf
Bacteria							
α-Proteobacteria	2,5	3,0	1,4	0,0	0,0	0,0	1,9
β-Proteobacteria	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8
γ-Proteobacteria	22,3	17,9	7,0	2,9	10,2	1,2	0,0
δ-Proteobacteria	23,1	13,4	7,0	24,6	27,1	65,5	17,3
ε-Proteobacteria	14,9	13,4	0,0	1,5	3,4	0,0	1,9
Acidobacteria	3,3	4,5	4,2	1,5	1,7	0,0	0,0
Actinobacteria	5,8	1,5	5,6	0,0	0,0	0,0	1,9
Bacteroidetes	5,0	9,0	4,2	1,5	5,1	1,2	1,9
Chlorobi	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Chloroflexi	5,8	4,5	42,3	13,0	3,4	2,3	19,2
Deferribacteres	0,0	6,0	1,4	0,0	1,7	1,2	0,0
Desulfurella group	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	1,2	0,0
Firmicutes	1,7	6,0	1,4	1,5	1,7	0,0	3,9
JS1	1,7	4,5	15,5	34,8	28,8	18,4	11,5
JS1_related unaffiliated group	0,0	0,0	1,4	1,5	0,0	1,2	3,9
OD1/OP11	5,0	1,5	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0
OP5/AC1	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
OP8	1,7	3,0	1,4	2,9	1,7	2,3	0,0
Planctomycetes	1,7	3,0	4,2	0,0	3,4	1,2	3,9
Spirochaetes	1,7	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TM6	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Verrucomicrobia	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0
WS1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0
WS1_related unaffiliated group	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9
WS3	0,0	3,0	1,4	4,4	3,4	0,0	0,0
WS3_related unaffiliated group	0,0	1,5	0,0	1,5	0,0	1,2	5,8
WS6	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
WWE	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Unaffiliated group AM1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9
Unaffiliated group AM2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9
Unaffiliated group3	0,0	0,0	0,0	7,3	3,4	3,5	15,4
Archaea							
ANME-1		37,3	54,6	45,5	37,9	43,5	0,0
ANME-2a,b		51,0	36,4	9,1	36,2	0,0	6,3
ANME-2c		5,9	1,8	36,4	0,0	39,1	18,8
ANME-3		0,0	1,8	0,0	0,0	4,4	70,8
GoM Arc I		3,9	0,0	0,0	24,1	2,2	0,0
MBG-D		0,0	0,0	0,0	0,0	6,5	2,1
Methanomicrobiales		0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Methanosaeta</i> related		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1
Methanosarcinales		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Unaffiliated Methanosarcinales		2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MBG-B		0,0	3,6	6,1	1,7	4,4	0,0

Στον επιφανειακό ορίζοντα συνεπικράτησαν οι φυλότυποι των δ- (23,1%) και των γ- (22,3%) Proteobacteria. Αυξημένη παρουσία είχαν και οι φυλότυποι που αντιπροσωπεύουν ε-Proteobacteria (14,9%), ενώ σε αυτή την ομάδα ανήκει και ο AMSMV-0-B65, ο πιο άφθονος φυλότυπος σε αυτόν τον ορίζοντα. Τα φύλα Actinobacteria και Chloroflexi απαντήθηκαν σε ποσοστό 5,8%. Στα 5 cmbsf τα γ-Proteobacteria έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό αντιπροσώπευσης (17,9%) μεταξύ των ομάδων και ακολούθησαν δ- και ε- Proteobacteria σε ίσα ποσοστά (13,4%). Οι φυλότυποι των Bacterioidetes αποτέλεσαν το 9,0% της βιβλιοθήκης των κλώνων για αυτό το βάθος και οι φυλότυποι των Chloroflexi και Firmicutes το 6,0%. Στον ορίζοντα των 10 cmbsf τα Proteobacteria είχαν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης με ποσοστό σχετικής αφθονίας 7,0% τόσο για τα γ- όσο και για τα δ- Proteobacteria. Στον ορίζοντα αυτό φάνηκε να επικρατούν φυλότυποι του φύλου των Chloroflexi (42,3%).

Στα 15 cmbsf επικράτησαν αντιπρόσωποι του φύλου JS1. Ο πιο άφθονος φυλότυπος AMSMV-15-B20 εμφανίστηκε σε ποσοστό 34,8% σε αυτή τη βιβλιοθήκη αλλά βρέθηκε σε όλα τα βάθη του πυρήνα. Στο επιφανειακό δείγμα (AMSMV-0-B186) είχε σχετική αφθονία 1,7%, η οποία αυξήθηκε στα 5 cmbsf (AMSMV-5-B62) στο 4,5% και στα 10 cmbsf (AMSMV-10-B11) στο 15,5%. Το ποσοστό αντιπροσώπευσης της ομάδας των JS1 Bacteria πήρε τη μεγαλύτερη τιμή του στα 15 cmbsf και ελαττώθηκε λίγο στα 20 cmbsf (AMSMV-20-B1, 28,8%), αλλά τα JS1 παρέμειναν η επικρατούσα ομάδα και σε αυτό το βάθος. Η σχετική αφθονία των JS1 Bacteria μειώθηκε ακόμη περισσότερο στα 25 cmbsf (AMSMV-25-B55, 18,4%) και έφτασε στον ορίζοντα 30 cmbsf (AMSMV-30-B5) σε ποσοστό 11,6%.

Τα δ-Proteobacteria (Σχήμα 3.4A) εμφάνισαν σχετική αφθονία 24,6% και 27,1% στα 15 και 20 cmbsf αντίστοιχα. Κυριάρχησαν στα 25 cmbsf (65,6%) με πιο άφθονο φυλότυπο τον AMSMV-25-B51. Ενώ το ποσοστό τους ελαττώθηκε στα 30 cmbsf (17,31%). Στον ορίζοντα αυτό τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία είχαν τα Chloroflexi, ενώ σημαντικό ποσοστό είχε και η ομάδα Unaffiliated 3 (15,4%).

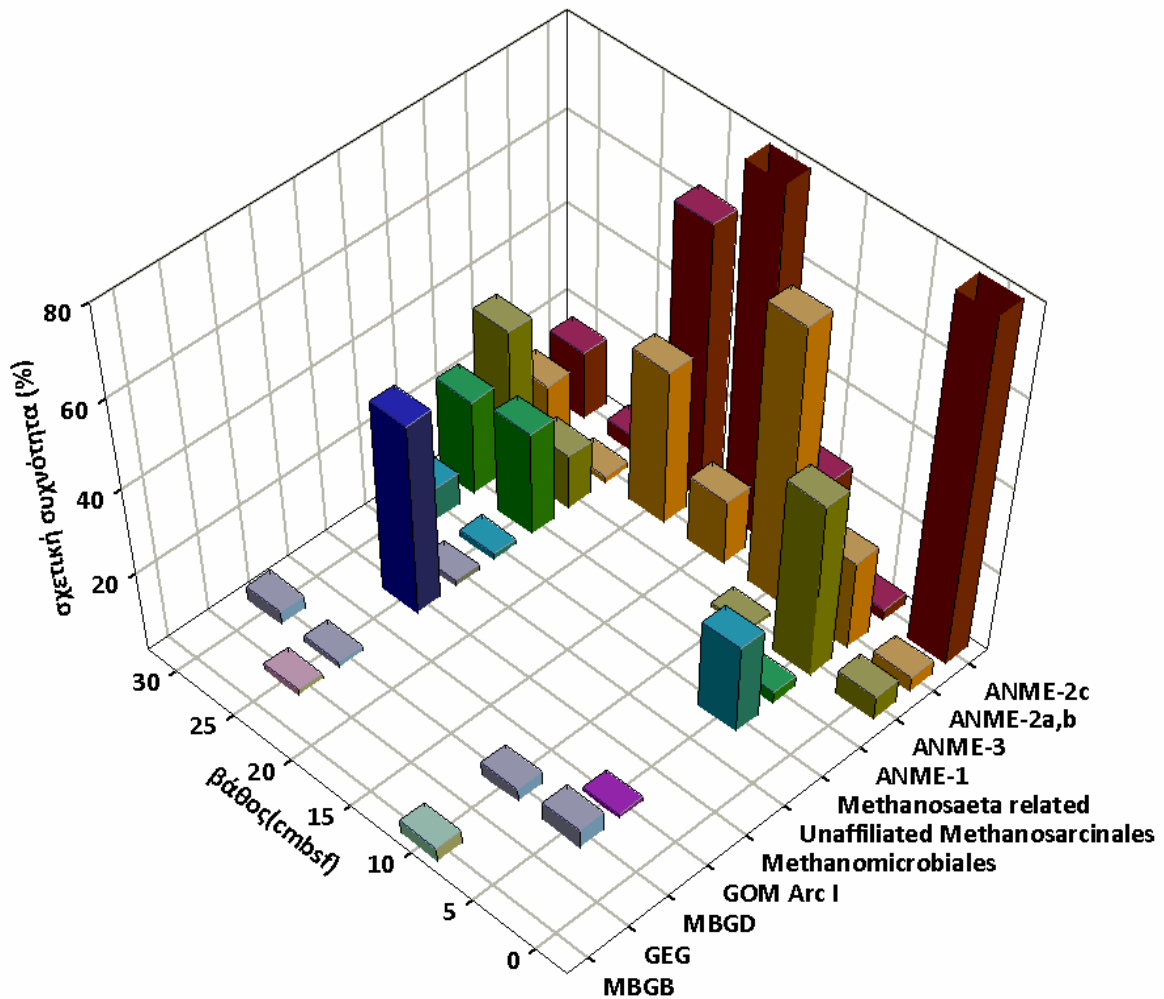
3.3.2.Kazan MV

3.3.2.1 Archaea

Συνολικά 242 κλώνοι του 16S rRNA γονιδίου των Archaea αλληλουχήθηκαν, οι οποίοι βρέθηκαν ότι ανήκουν σε 38 φυλοτύπους. Η συντριπτική πλειοψηφία των κλώνων (99,2% επί του συνόλου των κλώνων όλων των βιβλιοθηκών) ανήκε στα Euryarchaeota (Σχήμα 3.6 και 3.7).

Μόνο ένας φυλότυπος (KZNMV-10-A9) ομαδοποιήθηκε με τα Crenarchaeota (Σχήμα 3.7). Ο φυλότυπος αυτός ανήκει στην ομάδα των MBG-B, της οποίας μέλη απαντώνται συχνά σε βιβλιοθήκες κλώνων που προέρχονται από θαλάσσια ιζήματα και υδροθερμικά πεδία.. Οι φυλότυποι KZNMV-5-A12 (21,8%), KZNMV-30-A14 (8,3%) and KZNMV-25-A58 (4,6%) σχημάτισαν μια μονοφυλετική ομάδα (bootstrap value 100) που σχετίζεται με το *Methanosaeta* spp. Έξι φυλότυποι, σε χαμηλή αφθονία αλλά με παρουσία σε όλους εκτός από τον επιφανειακό ορίζοντα, ανήκουν στην ομάδα MBG-D.

Τέλος, ένας φυλότυπος από τα 5 cmbsf σχετίστηκε με την ομάδα GoM-I Arc και άλλος ένας από τα 25 cmbsf ομαδοποιήθηκε με τα GEG [Guaymas Euryarchaeotal Group, ομάδα που χαρακτηρίστηκε από τους Dhillon *et al.* (2005)] (Πίνακας 3.2, Σχήμα 3.6 και 3.7).

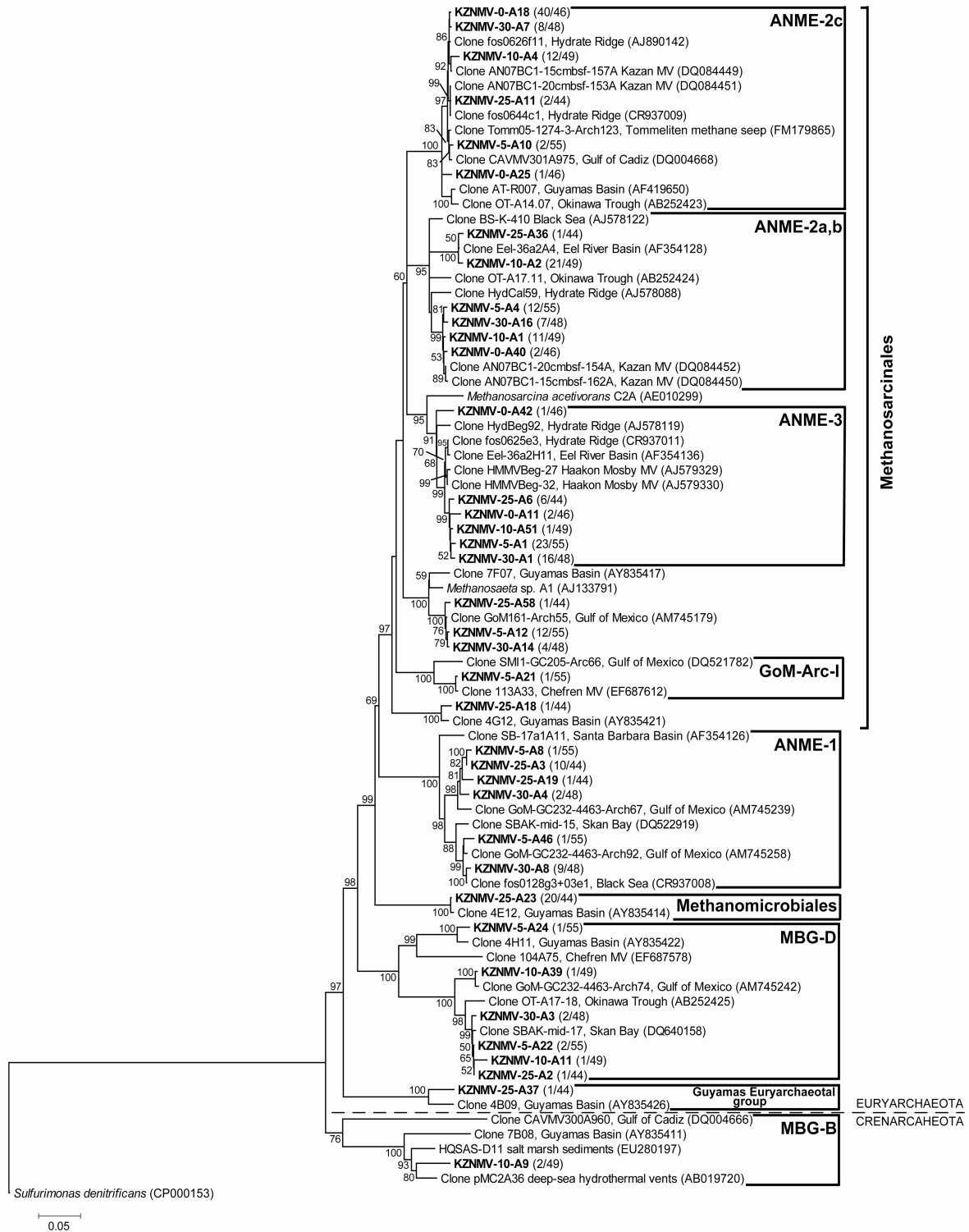


Σχήμα 3.6 Σχετική αφθονία των φυλογενετικών ομάδων στις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Archaea από ίζημα υλός του Kazan MV

3.3.2.2 Bacteria

Συνολικά 374 βακτηριακές αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου αναλύθηκαν και αντιστοιχήθηκαν σε 205 φυλοτύπους. Το φύλο των Proteobacteria ήταν το κυρίαρχο σε όλες τις βιβλιοθήκες κλώνων που κατασκευάστηκαν αλλά δε βρέθηκαν αντιπρόσωποι από όλες τις υποομάδες του (α-, β-, γ-, δ- και ε-) σε όλους τους ορίζοντες (Σχήμα 3.8). Οι υπόλοιποι φυλότυποι συσχετίστηκαν με: 10 φύλα που

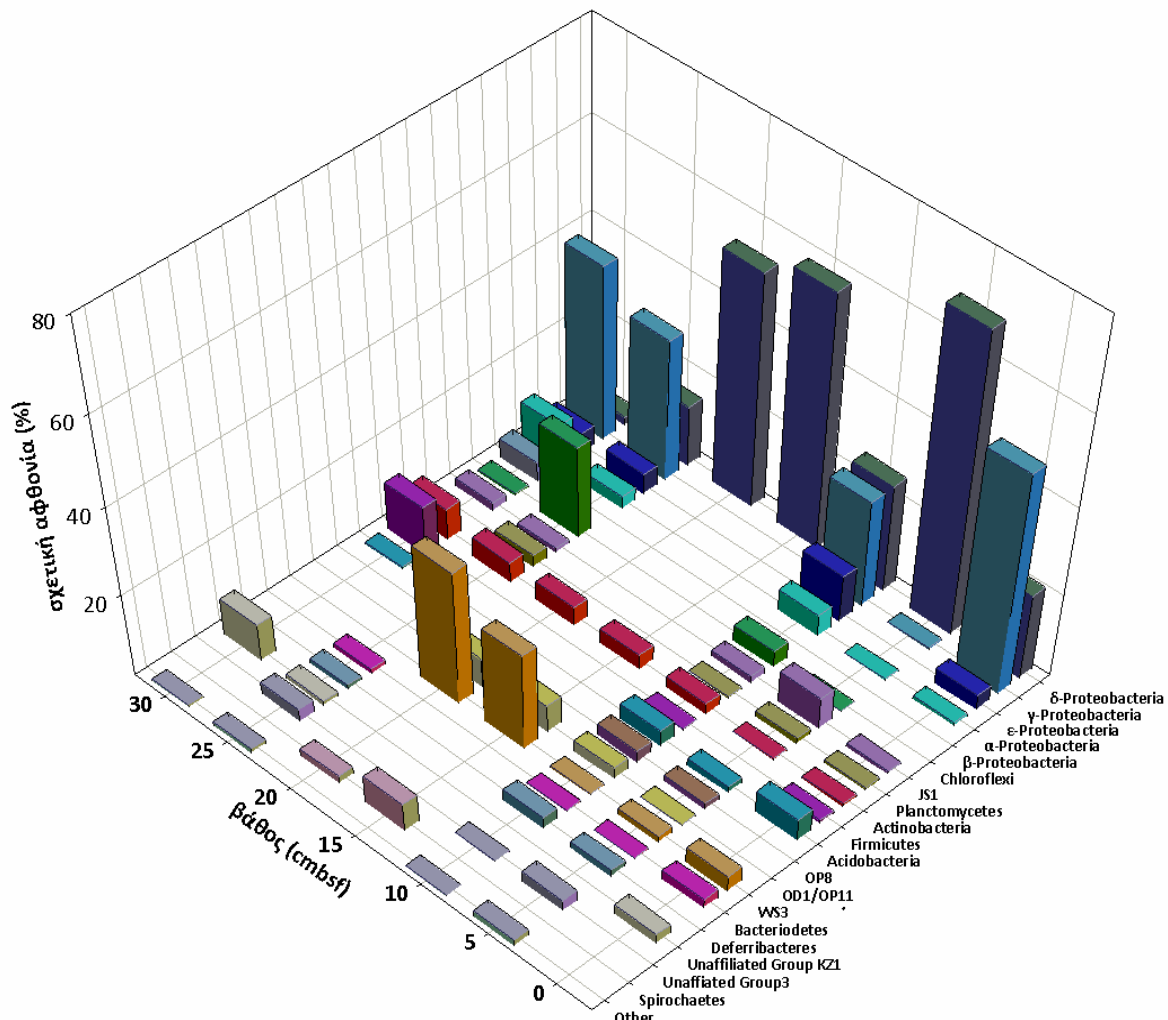
έχουν καλλιεργημένους αντιπρόσωπους: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacterioidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Deferribacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Planctomycetes, Elusimicrobia ή Termite Group 1 [TG1, φύλο που χαρακτηρίστηκε από τους Geissinger *et al.* (2009)], πέντε υποψήφια φύλα JS1, OP8, OD1/OP11, WS2, WS3 δεν ήταν δυνατό να σχετιστούν με ήδη γνωστές ομάδες Bacteria (Πίνακας 3.2).



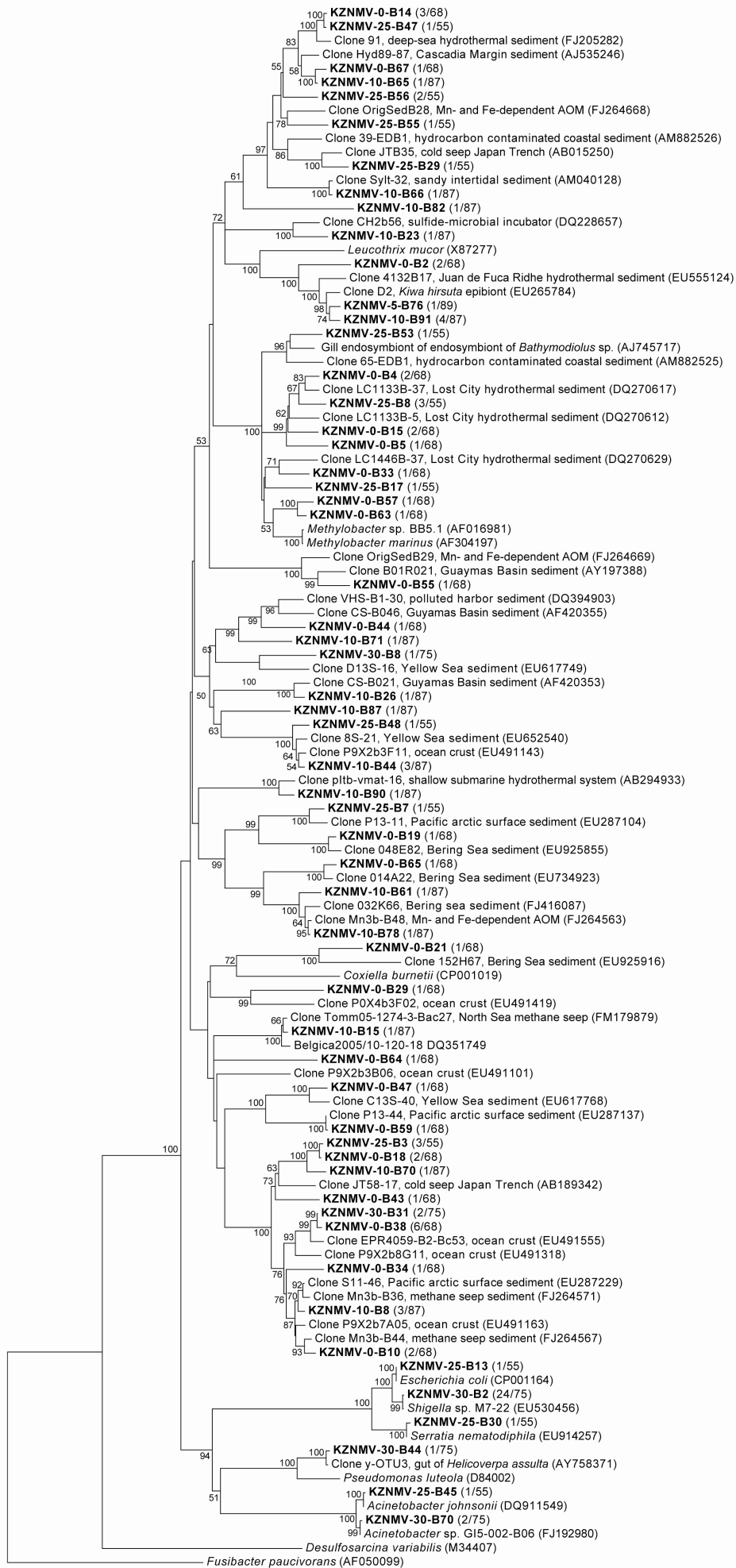
Σχήμα 3.7 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φυλοτύπων (ca. 1400 bp) των Archaea από ίζημα ιλύος του Kazan MV, βασισμένο στον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση αποστάσεων Kimura-2p. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών ($\geq 98\%$ ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις. Χίλιες επαναλήψεις bootstrap έλαβαν χώρα και τα ποσοστά μεγαλύτερα του 50% εμφανίζονται στους κόμβους των κλάδων. Οι αριθμοί στις αγκύλες είναι οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση δεδομένων GenBank. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 5% εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση.

Φυλότυποι των γ-Proteobacteria (Σχήμα 3.8, Σχήμα 3.9A και Πίνακας 3.2) κυριάρχησαν (51,5%) στον επιφανειακό ορίζοντα, καθώς και στους ορίζοντες 30 cmbsf (40,0%) και 25 cmbsf (32,7%). Τα γ-Proteobacteria συνεπικράτησαν στα 10 cmbsf (25,3%) μαζί με τα δ-Proteobacteria. Οι πιο άφθονοι φυλότυποι σε κάθε βιβλιοθήκη ήταν οι KZNMV-0-B38 (8,8%), KZNMV-30-B2 (32,0%) και KZNMV-10-B1 (10,3%), αντίστοιχα. Φυλότυποι των δ-Proteobacteria (Σχήμα 3.8) επικράτησαν στον ορίζοντα ιζήματος των 5 cmbsf (68,5%). Ο φυλότυπος που κυριάρχησε, ο KZNMV-5-B4 (34,8%) ομαδοποιήθηκε σε ένα μη

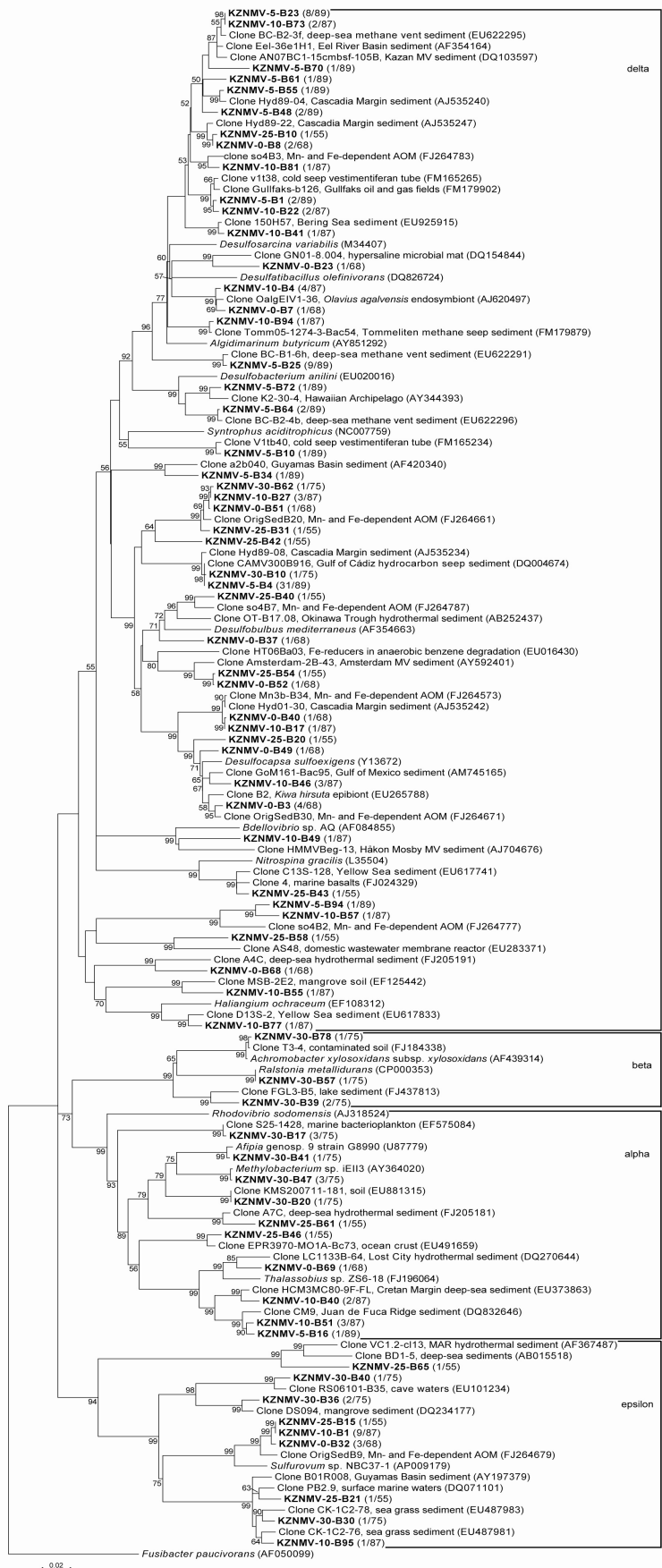
χαρακτηρισμένο κλάδο των Desulfobulbaceae. Φυλότυποι που ανήκουν στα the δ-Proteobacteria βρέθηκαν επίσης στα 10 (25,3%), 0 (20,6%) και 25 cmbsf (14,5%). Οι περισσότεροι από αυτούς τους φυλότυπους ανήκουν σε ομάδες θεϊκοαναγωγικών Bacteria. Στον ορίζοντα των 30 cmbsf μόνο το 2,7% των κλώνων ανήκε στα δ-Proteobacteria. Παρουσία των β-Proteobacteria ανιχνεύθηκε μόνο στα 30 cmbsf (Σχήμα 3.8 και Σχήμα 3.9B). Τρεις φυλότυποι, οι KZNMV-30-B38, KZNMV-30-B57 και KZNMV-30-B78, αποτέλεσαν το 5,3% της βιβλιοθήκης κλώνων αυτού του ορίζοντα.



Σχήμα 3.8 Σχετική αφθονία των φυλογενετικών ομάδων στις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίων των Bacteria σε ίζημα ιλύος του Kazan MV. Παρουσιάζονται μόνο οι φυλογενετικές ομάδες που έχουν ποσοστό $\geq 2\%$ σε μία τουλάχιστον από τις βιβλιοθήκες. Τα ποσοστά των υπόλοιπων ομάδων (παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 3.2) έχουν αθροιστεί και περιλαμβάνονται στην ομάδα Other

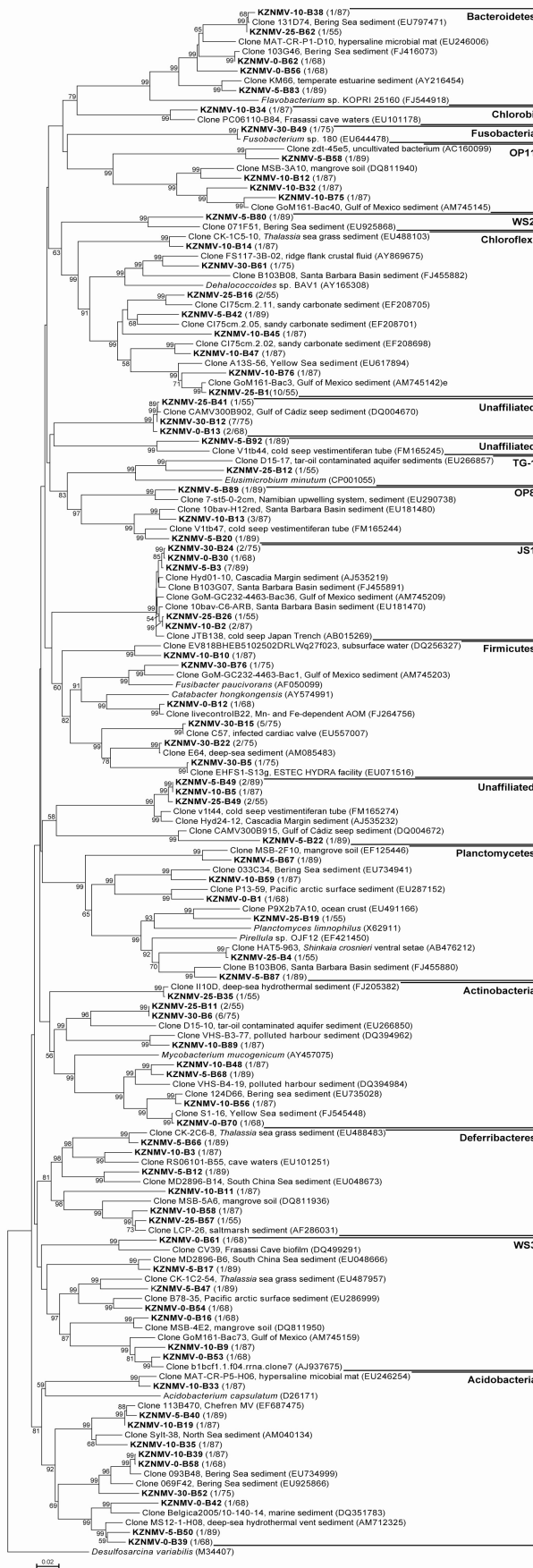


a



b

Σχήμα 3.9 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φυλοτύπων (ca. 1400 bp) των γ-Proteobacteria (a) και των υπόλοιπων Proteobacteria (b) από ίζημα λύος του Kazan MV, βασισμένο στον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση αποστάσεων Kimura-2p. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών (≥98% ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις.



Σχήμα 3.10 Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φυλοτύπων (ca. 1400 bp) των Bacteria (εκτός των Proteobacteria) από ιζημα υλός του Kazan MV, βασισμένο στον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση αποστάσεων Kimura-2p. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών ($\geq 98\%$ ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις.

Πίνακας 3.2 Φυλογενετική ομαδοποίηση και σχετική αφθονία (σε ποσοστό %) των φυλοτύπων που προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων 16S RNA γονιδίου των ιζημάτων του Kazan MV. Με σκίαση και έντονη γραφή παρουσιάζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά της κάθε βιβλιοθήκης ενώ με έντονη γραφή χωρίς σκίαση παρουσιάζονται τα δεύτερα επικρατέστερα

	0	5	10	15	20	25	30
	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf	cmbfsf
<i>Bacteria</i>							
α-Proteobacteria	1,5	1,1	5,7	0,0	0,0	3,6	10,7
β-Proteobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3
γ-Proteobacteria	51,5	1,1	25,3	0,0	0,0	32,7	40,0
δ-Proteobacteria	20,6	68,5	25,3	58,0	53,2	14,5	2,7
ε-Proteobacteria	4,4	0,0	11,5	0,0	0,0	5,5	5,3
Acidobacteria	5,9	2,2	4,6	0,0	0,0	0,0	1,3
Actinobacteria	1,5	1,1	3,4	4,3	5,1	5,5	8,0
Bacterioidetes	2,9	1,1	1,1	0,0	0,0	1,8	0,0
Chlorobi	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Chloroflexi	0,0	1,1	4,6	0,0	0,0	21,8	1,3
Deferribacteres	0,0	2,2	3,4	0,0	0,0	1,8	0,0
Firmicutes	1,5	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	12,0
Fusobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
JS1	1,5	7,9	2,3	0,0	0,0	1,8	2,7
OP11	0,0	1,1	3,4	7,2	7,6	0,0	0,0
OP8	0,0	2,2	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Planctomycetes	1,5	2,2	1,1	0,0	0,0	3,6	0,0
Spirochaetes	0,0	0,0	0,0	7,2	2,5	0,0	0,0
TG1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0
WS2	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
WS3	4,4	2,2	1,1	23,2	31,6	0,0	0,0
Unaffiliated group KZ1	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	9,3
Unaffiliated group KZ2	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Unaffiliated group3	0,0	3,4	1,2	0,0	0,0	3,6	0,0
<i>Archaea</i>							
ANME-1	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	25,0	22,9
ANME-2a,b	4,3	21,8	65,3	16,3	36,7	2,3	14,6
ANME-2c	89,1	3,6	24,5	83,7	63,3	4,5	16,7
ANME-3	6,5	41,8	2,0	0,0	0,0	13,6	33,3
GEG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0
GoM Arc I	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MBG-D	0,0	5,5	4,1	0,0	0,0	2,3	4,2
Methanomicrobiales	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,5	0,0
<i>Methanosaeta</i> related							
Methanosarcinales	0,0	21,8	0,0	0,0	0,0	2,3	8,3
Unaffiliated Methanosarcinales	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0
MBG-B	0,0	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0

Τα α-Proteobacteria παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αφθονία τους (10,7%) στα 30 cmbsf (Σχήμα 3.8). Τρεις από τους τέσσερεις KZNMV-30 φυλοτύπους που ανήκουν στην ομάδα των α-Proteobacteria σχημάτισαν ένα διακριτό φυλογενετικό κλαδί σε σχέση με τους φυλοτύπους που προέρχονται από τους υπόλοιπους ορίζοντες (Σχήμα 3.9B). Αυτό το φυλογενετικό κλαδί περιλαμβάνει το *Methylobacterium sp.*, γνωστό μεθυλότροφο βακτήριο. Στα 10 cmbsf το ποσοστό των α-Proteobacteria ήταν 5,7%, στα 25 cmbsf 3,6% και ~1% στα 0 και 5 cmbsf.

Φυλότυποι των ε-Proteobacteria (Σχήμα 3.8) βρέθηκαν σε όλους τους ορίζοντες εκτός από αυτόν στα 5 cmbsf. Στα 0, 25 και 30 cmbsf ~5% των αλληλουχιών που βρέθηκαν σε κάθε βιβλιοθήκη ανήκουν στα ε-Proteobacteria, ενώ το ποσοστό σχετικής αφθονίας τους έφτασε το 11,5% στα 10 cmbsf. Ο κυρίαρχος φυλότυπος μεταξύ των ε-Proteobacteria σε αυτό τον ορίζοντα ήταν ο KZNMV-10-B1 (Σχήμα 3.9B), ο οποίος βρέθηκε επίσης στον επιφανειακό ορίζοντα (KZNMV-0-B32) και σε αυτόν στα 25 cmbsf (KZNMV-25-B21) και ομαδοποιήθηκε στο φυλογενετικό κλάδο του *Sulfurovum sp.*

Όσον αφορά τους υπόλοιπους φυλοτύπους, κλώνοι που ανήκουν στην ομάδα των JS1 Bacteria υπήρχαν σε όλες τις βιβλιοθήκες του 16S rRNA γονιδίου που κατασκευάστηκαν. Όλοι οι φυλότυποι από τα βάθη που εξετάστηκαν εμφανίζουν ομοιότητα μεγαλύτερη του 98% μεταξύ του και ουσιαστικά αντιστοιχούν στον ίδιο φυλότυπο. Το ποσοστό σχετικής αφθονίας τους, κυμαίνεται γύρω στο 2% στις αντίστοιχες βιβλιοθήκες κλώνων αλλά εμφανίζεται αυξημένο στη βιβλιοθήκη των 5 cmbsf προσεγγίζοντας το 8%.

Μέλη της ομάδας των Chloroflexi εμφάνισαν αυξημένη παρουσία στον ορίζοντα των 25 cmbsf (21,8%). Ο κυρίαρχος φυλότυπος

σε αυτό τον ορίζοντα, ο KZNMV-25-1 (Σχήμα 3.10), εμφανίζει σημαντική ομοιότητα (99%) με αλληλουχίες που προέρχονται από ιζήματα υλός του Κόλπου του Μεξικού. Αλληλουχίες που ανήκουν στα Chloroflexi βρέθηκαν σε όλα τα εξεταζόμενα βάθη εκτός από το επιφανειακό. Αλληλουχίες που σχετίζονται με το φύλο Fimicutes (Σχήμα 3.10) βρέθηκαν στα 30 cmbsf σε ποσοστό 12% (Σχήμα 3.8), ενώ παρατηρήθηκαν σε χαμηλούς αριθμούς στους ορίζοντες των 0 cmbsf (1,5%) και 10 cmbsf (1,1%).

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κάλυψη των βιβλιοθηκών κλώνων, όπως προέκυψε από τον εκτιμητή κάλυψης Good's C θεωρείται (Kemp & Aller 2004) περισσότερο ικανοποιητική για τα Archaea σε σχέση με τα Bacteria. Αυτό υποδηλώνει ότι στις βιβλιοθήκες κλώνων που κατασκευάστηκαν, η πλειονότητα των φυλοτύπων των Archaea έχει αποκαλυφθεί ενώ για τα Bacteria βρέθηκαν μόνο οι πιο άφθονοι και μερικοί από τους φυλοτύπους με χαμηλή αφθονία. Αυτό γίνεται φανερό και από τον υψηλότερο αριθμό φυλοτύπων που έχουν ένα μόνο αντιπρόσωπο, στις βιβλιοθήκες των Bacteria σε σχέση με αυτές των Archaea.

Οι κοινότητες των Archaea και στα δύο ηφαίστεια, Amsterdam και Kazan MV, σε όλους τους ορίζοντες ιζήματος που εξετάστηκαν σχετίζονται με το μεταβολισμό του μεθανίου. Σε υψηλή σχετική αφθονία σε όλα τα βάθη που εξετάστηκαν βρέθηκαν Archaea που ανήκουν στις ομάδες ANME των Euryarchaeota, ομάδες ικανές να επιτελέσουν αναερόβια οξείδωση του μεθανίου. Στον ορίζοντα ιζήματος των 25 cmbsf του Kazan MV, ο κυρίαρχος φυλότυπος σχετίζεται στενά με το *Methanogenium marinum*, ένα μεθανιογόνο Αρχαίο που χρησιμοποιεί H₂, ενώ και σε άλλους ορίζοντες

ανιχνεύτηκε η παρουσία (σε μικρές σχετικές αφθονίες) πιθανά μεθανιογόνων Archaea. Η συνύπαρξη μεθανιότροφων και μεθανιογόνων είναι δεν είναι συνήθης αλλά ωστόσο έχει αναφερθεί σε βιβλιοθήκες κλώνων από περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο (Hallam *et al.* 2003, Karr *et al.* 2006, Lösekann *et al.* 2007, Parkes *et al.* 2007, Goffredi *et al.* 2008). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις και για τις υπόλοιπες ομάδες που αναγνωρίστηκαν, τόσο για τις GoM Arc I, GEG και MBG-D των Euryarchaeota (Dhillon *et al.* 2005, Knittel *et al.* 2005, Teske & Sørensen 2008, Knittel & Boetius 2009) όσο και την MBG-B των Crenarchaeota (Inagaki *et al.* 2006b), ότι σχετίζονται με το μεταβολισμό του μεθανίου, αν και ο ακριβής ρόλος τους παραμένει προς το παρόν αδιευκρίνιστος. Για την ομάδα των MBG-B, υπάρχουν ενδείξεις από άλλους ερευνητές (Biddle *et al.* 2006) ότι πρόκειται για ετερότροφους μικροοργανισμούς.

Παρόμοια πειραματική προσέγγιση σε μικρότερη όμως κατακόρυφη ανάλυση για το Kazan MV (Heijs *et al.* 2007) έδειξε μεγαλύτερη διαφοροποίηση των κοινοτήτων Archaea που υπάρχουν κατά μήκος του ιζήματος. Archaea του Marine Group I των Crenarchaeota, ομάδα των Archaea που θεωρούνται πελαγικής προέλευσης, επικράτησαν στο επιφανειακό στρώμα ιζήματος (0-6cm) ενώ ένας καινούριος κλάδος των Crenarchaeota επικράτησε και στον οριζόντια 6-22cm. Τα Methanosarcinales είχαν τη μεγαλύτερη σχετικά αφθονία μόνο στο βαθύτερο τμήμα του πυρήνα (22-34cmbsf), σε αντίθεση με τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία, που εμφάνισαν υψηλά ποσοστά των Methanosarcinales σε όλο το μήκος του πυρήνα που μελετήθηκε από το Kazan MV.

Η διαφοροποίηση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε (κυρίως στην εκχύλιση του

DNA και στη χρήση των εκκινητών της PCR) όπως και η χρονική απόσταση των δειγματοληψιών των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντίστοιχες μελέτες μπορεί να εξηγήσει μερικώς τη διαφοροποίηση των κοινοτήτων των Archaea αλλά ο σημαντικότερος ίσως παράγοντας που επιδρά σε αυτό είναι η χωρική απόσταση μεταξύ τους. Αν και απόσταση μεταξύ δύο θέσεων είναι μόνο 30m, ένα ηφαιστειο ιλύος, όπως είναι γνωστό, εμφανίζει ανομοιομορφία στην κατανομή της ροής και συγκέντρωσης του μεθανίου (αλλά και των υπόλοιπων οργανικών και ανόργανων ενώσεων) σε όλη την έκταση του, και αντίστοιχη διαφοροποίηση των κοινοτήτων που στηρίζονται μεταβολικά στο μεθάνιο και τις άλλες ενώσεις, προϊόντων της AOM (Niemann 2005, Niemann *et al.* 2006b).

Ωστόσο και μεταξύ των δύο ηφαιστειών Amsterdam και Kazan που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία αλλά και των διαφορετικών οριζόντιων ιζήματος του ίδιου ηφαιστείου υπάρχουν διαφορές στις σχετικές αφθονίες των ANME υποομάδων 1, 2 και 3. Ένα γενικό πρότυπο κατακόρυφης κατανομής των ομάδων ANME, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.1 δείχνει υψηλά ποσοστά των ANME-1 και τον ANME-2 σε όλο το μήκος του πυρήνα που μελετήθηκε από το Amsterdam MV, εκτός από τον οριζόντια των 30 cmbsf, όπου τα ANME-1 απουσιάζουν και κυριαρχούν τα ANME-3. Στο Kazan MV, αντίθετα, σημαντική παρουσία ANME-1 καταγράφηκε μόνο στους βαθύτερους οριζόντιους των 25 και 30 cmbsf. Η συγκέντρωση του μεθανίου, αν κυμαίνεται σε διαφορετικό εύρος μεταξύ των δύο ηφαιστειών (βλέπε κεφάλαιο 2) δεν πιθανολογείται ως ο μόνος παράγοντας που διαφοροποιεί τις βιοκοινότητες των Archaea.

Παρουσία των ANME έχει ανιχνευθεί, εκτός από θαλάσσια ιζήματα που σχετίζονται

με το μεθάνιο, σε ανοξικές μάζες νερού καθώς και ηπειρωτικά περιβάλλοντα. όπως λιμναία νερά και ιζήματα, εδάφη και υδροφόρους ορίζοντες (Grossman *et al.* 2002, Stein *et al.* 2002, Wakeham *et al.* 2003, Eller *et al.* 2005, Alain *et al.* 2006, López-Archilla *et al.* 2007). Τα Archaea των υποομάδων ANME-1 και ANME-2 φαίνεται να έχουν παγκόσμια εξάπλωση σε αυτά, ενώ τα ANME-3 περιορίζονται στα υποθαλάσσια ηφαίστεια υλός (Knittel & Boetius 2009). Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για το αν η κυριαρχία των ANME-1 ή των ANME-2 σχετίζεται με την υψηλή συγκέντρωση μεθανίου (Blumenberg *et al.* 2005, Girguis *et al.* 2005, Orcutt *et al.* 2005). Τόσο τα ANME-1 όσο και τα ANME-2 έχουν βρεθεί σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και ρών μεθανίου (Lloyd *et al.* 2006).

Δύο συστήματα ψυχρών αναβλύσεων έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα στα οποία επικρατούν Archaea της ομάδας ANME-1, ιζήματα που επικάθονται σε μία πλούσια σε μεθάνιο αλμυρή λίμνη στον Κόλπο του Μεξικού (Lloyd *et al.* 2006) και μικροβιακοί τάπητες από τη Μαύρη Θάλασσα (Knittel *et al.* 2005). Από τη μελέτη των συστημάτων αυτών προκύπτει ότι άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η αλατότητα μπορεί να καθορίζουν την επικράτηση διαφορετικών ομάδων των ANME. Παρουσία των ANME-1 ή αύξηση της σχετικής αφθονίας αυτών στους βαθύτερους ορίζοντες ιζημάτων όπως εμφανίστηκε στο ηφαίστειο υλός Kazan έχει παρατηρηθεί και σε άλλα συστήματα που σχετίζονται με το μεθάνιο (Niemann *et al.* 2005, Lloyd *et al.* 2006, Lösekann 2006, Nunoura *et al.* 2006, Harrison *et al.* 2009).

Η ανεκτικότητα στο οξυγόνο των διαφόρων ομάδων είναι ένας παράγοντας σχετίζεται με τη σχετική αφθονία αυτών σε κάθε οικοσύστημα. Για τους μεθανιογόνους

μικροοργανισμούς είναι γνωστό ότι δεν είναι καθόλου ανεκτικοί σε παρουσία οξυγόνου λόγω της οξειδοαναγωγικής ευαισθησίας των ενζυμικών συμπαραγόντων τους (Jarrell 1985). Ωστόσο, τα ANME φαίνεται ότι μπορούν να ανεχθούν την παρουσία οξυγόνου και έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η συγκέντρωση οξυγόνου λειτουργεί ως παράγοντας επιλογής (Blumenberg *et al.* 2004, Knittel *et al.* 2005).

Τα Bacteria, από όσα γνωρίζουμε σήμερα, δεν μπορούν να οξειδώσουν αναερόβια το μεθάνιο αλλά αρκετές ομάδες συμμετέχουν έμμεσα στη διεργασία της AOM ως σύντροφοι των Archaea που την επιτελούν, ενώ κάποιες ομάδες μπορούν να οξειδώσουν αερόβια το μεθάνιο (Madigan *et al.* 2008, Knittel & Boetius 2009).

Εκπρόσωποι των δ-Proteobacteria, υπόφυλο στο οποίο ανήκουν οι περισσότεροι από τους γνωστούς, σήμερα, βακτηριακούς συντρόφους των ANME βρέθηκαν στις βιβλιοθήκες κλώνων όλων των βαθών και για τα δύο ηφαίστεια. Αποτέλεσαν δε, την πλειοψηφία (>50%) των κλώνων που αναλύθηκαν στα 25 cmbsf του Amsterdam MV και στα 5, 15, 20 cmbsf του Kazan MV. Οι φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν έδειξαν υψηλή ποικιλότητα. Κάποιοι ομαδοποιήθηκαν με γνωστές και καλά χαρακτηρισμένες τάξεις των δ-Proteobacteria (όπως Desulfobacterales, Syntrophobacterales, Bdellovibrionales and Myxococcales), οι περισσότεροι φυλότυποι όμως, (ιδιαίτερα στις βιβλιοθήκες που τα δ-Proteobacteria παρουσιάστηκαν με σημαντική αντιπροσώπευση) ομαδοποιήθηκαν τους κλάδους των θειικοαναγωγικών Bacteria που σχετίζονται με ψυχρές αναβλύσεις, και συγκεκριμένα τους κλάδους: SEEP-SRB1 (σχετιζόμενο με τα *Desulfosarcina/Desulfococcus*, DSS), τα SEEP-SRB3 ή DBB (σχετιζόμενα με τα *Desulfobulbus*) και SEEP-

SRB4 (σχετιζόμενα με τα *Desulforhopalus*). Τα μέλη της SEEP-SRB1 θεωρούνται ως οι σύντροφοι των ANME-1 και ANME-2 (Dhillon *et al.* 2003, Knittel *et al.* 2003, Lösekann *et al.* 2007), τα SEEP-SRB3 έχουν προταθεί ως σύντροφοι των ANME-3 (Lösekann *et al.* 2007) ενώ ο οικολογικός ρόλος των SEEP-SRB4 παραμένει αδιευκρίνιστος αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκονται στην AOM.

Αρκετοί φυλότυποι των δ-Proteobacteria, τόσο από το Amsterdam όσο και από το Kazan MV ομαδοποιήθηκαν με το *Desulfobacterium anilii* και σχετιζόμενες με αυτό περιβαλλοντικούς κλώνους. Αυτή η ομάδα, είναι γνωστό, ότι περιλαμβάνει πολλούς καλλιεργημένους και μη αποικοδομητές υδρογονανθράκων, Bacteria, δηλαδή, που έχουν τη δυνατότητα να οξειδώνουν πλήρως διαφόρων τύπων υδρογονάνθρακες, συμπεριλαμβανομένων και των αρωματικών (Harms *et al.* 1999).

Μεταξύ των φυλοτύπων που ανήκουν στα μη-SRB δ-Proteobacteria, βρέθηκαν φυλότυποι που σχετίζονται με τα *Bdellovibrio sp.* και *Bacterionorax sp.*, γένη που είναι θηρευτές Bacteria (Baer *et al.* 2000) και φυλότυποι του ανήκουν στα Myxococcales, ομάδα που συχνά απαντάται σε θαλάσσια ιζήματα (Ravenschlag *et al.* 1999, Wilms *et al.* 2006b, Zhang *et al.* 2008).

Μεγάλη ήταν η σχετική αφθονία και η ποικιλότητα των γ-Proteobacteria στο ιζημα και των δύο ηφαιστειών ιλύος που μελετήθηκαν. Παρουσία των γ-Proteobacteria έχει αναφερθεί σε ποικίλα θαλάσσια ιζήματα (Li *et al.* 1999b, Bowman & McCuaig 2003, Inagaki *et al.* 2003, Bowman *et al.* 2005, Polymenakou *et al.* 2005a, Zeng *et al.* 2005, Ye *et al.* 2009). Η οικοφυσιολογία τους γενικά είναι ποικίλη στα ιζήματα όμως που μελετήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας φαίνεται ότι επικράτησαν

μέλη των γ-Proteobacteria που σχετίζονται με τον κύκλο του θείου. Πρόκειται για φυλοτύπους που συσχετίστηκαν με γνωστά θειοοξειδωτικά Bacteria αλλά κυρίως για φυλοτύπους που βρέθηκε ότι ανήκουν σε ομάδες που δεν έχουν καλλιεργημένους αντιπροσώπους αλλά προέρχονται από περιβάλλοντα ψυχρών αναβλύσεων, ιζήματα μεθανιούδριτών και υδροθερμικών πεδίων ή συμβιωτικούς και επιβιωτικούς μικροοργανισμούς που πιστεύεται ότι οξειδώνουν ανηγμένες ενώσεις του θείου (Teske *et al.* 2002, Bowman & McCuaig 2003, Inagaki *et al.* 2003).

Κάποιοι φυλότυποι των γ-Proteobacteria που βρέθηκαν σχετίστηκαν με τα *Methylobacter sp.* και *Methylomonas sp.*, μεθανιότροφα Bacteria τύπου I (Garrity *et al.* 2001). Τα Bacteria αυτά επιτελούν αερόβια οξείδωση του μεθανίου και για το λόγο αυτό, περιορίζονται στα 0 και 5 cmbsf για το Amsterdam MV, όπου είναι δυνατή η διείδυση οξυγόνου. Παραδόξως, οι αντίστοιχοι φυλότυποι για το Kazan MV εμφανίζονται στα 10 cmbsf. Σε αυτό το βάθος, σε κάποιες περιπτώσεις είναι δυνατή η παρουσία οξυγόνου, ιδιαίτερα αν υπάρχουν βενθικοί οργανισμοί που αρδεύουν το ιζημα. Παρουσία αντιστοιχών μικροοργανισμών έχει αναφερθεί στον ορίζοντα ιζήματος 6-22cmbsf για το Kazan MV (Heijs *et al.* 2007) και η παρουσία τους αποδόθηκε σε βιοαναμόχλευση, χωρίς ωστόσο να αναφέρονται δεδομένα που να υποστηρίζουν αυτή την άποψη. Μια διαφορετική εξήγηση, θα ήταν η παρουσία των μικροοργανισμών αυτών λόγω της συμβίωσής τους με τους βενθικούς οργανισμούς, που έχουν καταγραφεί στην περιοχή αλλά και έχουν διαπιστωθεί να υπάρχουν και στα ιζήματα που αναλύθηκαν σε αυτή την εργασία (κεφάλαιο 2).

Ωστόσο είναι επίσης πιθανή μία σχετικά πρόσφατη ροή ιλύος που μπορεί να

έχει διαταράξει τη στρωμάτωση του ιζήματος. Ίσως, επομένως, τα μεθανιότροφα αυτά Bacteria να βρέθηκαν σε βαθύτερα στρώματα λόγω ροής ιλύος στην επιφάνεια, όπου μπορούν να επιβιώσουν λόγω της ανθεκτικότητάς τους σε παρατεταμένες περιόδους ανοξίας αλλά της δυνατότητας που έχουν για τη δημιουργία σπορίων. Αερόβιοι μικροοργανισμοί ή δυνητικά αερόβιοι έχουν απομονωθεί και από ακόμα βαθύτερα ιζήματα στα οποία δεν υπάρχει αντίστοιχη περίπτωση διατάραξης των ιζημάτων (Körke *et al.* 2005). Επομένως, η ροή ιλύος δεν είναι η μοναδική εξήγηση για την ύπαρξη των οργανισμών αυτών στο εσωτερικό του ιζήματος.

Οι φυλότυποι των ε-Proteobacteria που βρέθηκαν στις βιβλιοθήκες κλώνων και των δύο ηφαιστειών σχετίστηκαν με φυλοτύπους προερχόμενους από ιζήματα βαθιάς θάλασσας, υδροθερμικά πεδία, σπήλαια και ψυχρές αναβλύσεις. Ο μόνος καλλιεργημένος μικροοργανισμός που περιλαμβάνεται σε αυτόν τον φυλογενετικό κλάδο είναι το *Sulfuronum lithotrophicum*, ένα θειοοξειδωτικό χημειολιθοαυτότροφο βακτήριο που απομονώθηκε από υδροθερμικά ιζήματα (Inagaki *et al.* 2004a). Επομένως, και φυλότυποι που ανήκουν στα ε-Proteobacteria εμπλέκονται πιθανά, μαζί με μέλη των γ-Proteobacteria στον κύκλο του θείου στα ηφαιστεια ιλύος που μελετήθηκαν.

Τα JS1 Bacteria διαδραματίζουν πιθανά σημαντικό ρόλο στα ιζήματα των υποθαλάσσιων ηφαιστειών ιλύος Amsterdam και Kazan. Ο ίδιος φυλότυπος ανιχνεύθηκε και στα δύο ηφαιστεια ιλύος, σε όλες τις βιβλιοθήκες κλώνων που κατασκευάστηκαν, δηλαδή, πρακτικά σε όλο το μήκος των πυρήνων. Η απουσία τους από τις βιβλιοθήκες κλώνων των 15 και 20 cmbsf του Kazan MV από τους Kormas *et al.* (2008) μάλλον οφείλεται στη

μεθοδολογική διαφοροποίηση που ακολουθήθηκε και δεν υποβαθμίζει τη σημασία της παρουσίας του ίδιου φυλοτύπου σε συνδυασμό με την αυξημένη σχετική αφθονία αυτού, κυρίως στο Amsterdam MV. Οι κοντινότεροι συγγενείς του φυλοτύπου που βρέθηκε στα ιζήματα ιλύος της Ανατολικής Μεσογείου που αναλύθηκαν για αυτή τη μελέτη προέρχονται από ιζήματα μεθανιουδριτών του Κόλπου του Μεξικού και ιζήματα από τη ζώνη μετάβασης μεθανιουθαικών [Sulfate Methane Transition Zone, SMTZ] στη Λεκάνη Santa Barbara, Καλιφόρνια.

Το υποψήφιο φύλο των JS1 αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα (Webster *et al.* 2004) και μέχρι σήμερα δε διαθέτει καλλιεργημένους αντιπροσώπους. Οι περιβαλλοντικοί κλώνοι που ταυτοποιήθηκαν στην ομάδα των JS1 Βακτηριών σχετίζονται με ιζήματα βαθέων θαλασσών (Li *et al.* 1999a, Inagaki *et al.* 2003, Newberry *et al.* 2004, Webster *et al.* 2006a, Parkes *et al.* 2007) και πιστεύεται ότι αποτελούν ένα κλάδο Bacteria που χαρακτηρίζει τη βιόσφαιρα της υποεπιφάνειας του πυθμένα των θαλασσών (Teske 2006). Ωστόσο, εκτός από αυτό το περιβάλλον αλληλουχίες Bacteria της ομάδας JS1 έχουν βρεθεί σε ανοξικά ιζήματα, ιζήματα μεθανιουδριτών (Reed *et al.* 2002, Inagaki *et al.* 2003), θαλάσσια και χερσαία ηφαιστεια ιλύος (Alain *et al.* 2006, Niemann *et al.* 2006b), σε επιφανειακά ιζήματα θαλάσσιων υδροθερμικών πεδίων (Teske *et al.* 2002) και περιβάλλοντα ιζήματος που λαμβάνει χώρα θεική αναγωγή σε συνδυασμό με αποικοδόμηση βενζενίου (Phelps *et al.* 1998) και χρησιμοποίηση οξικού (Webster *et al.* 2006b). Αν και η εξάπλωση των JS1 είναι αρκετά ευρεία, όπως φαίνεται από τις προηγούμενες έρευνες, δεν έχει προσδοθεί στην ομάδα αυτή κάποιος βιογεωχημικός ρόλος. Πιστεύεται όμως

ότι η οικοφυσιολογία τους σχετίζεται είτε με την παρουσία μεθανιοϋδριτών (Inagaki *et al.* 2006b), είτε με ανοξικά περιβάλλοντα υψηλής περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (αλλά χαμηλής ποιότητας, σε όρους βιοδιαθεσιμότητας).

Τα Chloroflexi ή Green Non-Sulfur Bacteria (GNS) φαίνεται να αποτελούν άλλο ένα φύλο με σημαντική παρουσία στα ιζήματα ιλύος του Amsterdam και Kazan MV. Το φύλο των Chloroflexi έχει διαχωριστεί σε τέσσερα υπόφυλα (Hugenholtz *et al.* 1998a, Rappe & Giovannoni 2003), από τα οποία το I, II και IV περιλαμβάνουν αντιπροσώπους από υποεπιφανειακά θαλάσσια ιζήματα και σχετικά περιβάλλοντα σε αντίθεση με το υπόφυλο III που έχει φωτότροφα ή αερόβια ετερότροφα μέλη. Οι φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν στις βιβλιοθήκες κλώνων των ιζημάτων των ηφαιστειών ιλύος Amsterdam και Kazan ανήκουν φυλογενετικά στα υπόφυλα I, II και IV, που σχετίζονται με φυλότυπους υποεπιφανειακών θαλάσσιων ιζημάτων. Τα καλλιεργημένα μέλη από αυτά τα υπόφυλα I, II και IV περιλαμβάνουν το αναερόβιο H₂-εξαρτώμενο αφαλογονωτικό Βακτήριο *Dehalococcoides ethenogenes* (Maymo-Gatell *et al.* 1997) και θερμόφιλα νηματοειδή Bacteria τα οποία αναπτύσσονται χημειοετερότροφα με διάφορους υδρογονάνθρακες (Sekiguchi *et al.* 2001, Sekiguchi *et al.* 2003). Τα υπόφυλα των Chloroflexi I, II και IV αποτελούν σημαντικό μέρος της υποεπιφανειακής βιόσφαιρας του πυθμένα των θαλασσών (Chandler *et al.* 1998, Reed *et al.* 2002, Inagaki *et al.* 2003, Kormas *et al.* 2003, Parkes *et al.* 2005, Inagaki *et al.* 2006a, Inagaki *et al.* 2006b, Webster *et al.* 2006a, Biddle *et al.* 2008). Έχουν ανιχνευτεί ως ομάδα με υψηλή σχετική αφθονία σε βιβλιοθήκες κλώνων σε οριζόντες σαπροπυλών (Coolen *et al.* 2002) αλλά σε προηγούμενες έρευνες που

έχουν γίνει για τα ηφαιστεια ιλύος του Αναξίμανδρου και συγκεκριμένα στον ορίζοντα ιζήματος των 6-22cm (Heijs *et al.* 2007).

Καθώς δεν έχουν απομονωθεί στελέχη των Chloroflexi από βαθειά υποεπιφανειακά ιζήματα για λεπτομερή ανάλυση της φυσιολογίας αυτών, ο ακριβής ρόλος τους στην υποεπιφανειακή βιόσφαιρα παραμένει υποθετικός, πιστεύεται όμως ότι εμπλέκονται στην αποικοδόμηση πολύπλοκων οργανικών ουσιών (Wilms *et al.* 2006a). Κάποιοι από τους φυλότυπους, πιθανά να χρησιμοποιούν H₂ και να ανταγωνίζονται για αυτό τους μεθανιογόνους οργανισμούς, όμως χρησιμοποιούν διαφορετική πηγή άνθρακα από αυτούς καθώς οι μεθανιογόνοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν μόνο αποικοδομημένες οργανικές ενώσεις (Wilms *et al.* 2006a).

Οι ομάδες επίσης των Planctomycetes, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes και άλλες που βρέθηκαν στα ιζήματα που εξετάστηκαν απαντώνται στις βιβλιοθήκες κλώνων από ιζήματα βαθέων θαλασσών και είναι αποικοδομητές οργανικών ενώσεων (Li *et al.* 1999b, Inagaki *et al.* 2003, Kormas *et al.* 2003, Parkes *et al.* 2005, Inagaki *et al.* 2006b, Teske 2006, Wilms *et al.* 2006b) ενώ έχουν βρεθεί και σε βιβλιοθήκες κλώνων από μικροβιακούς τάπητες και ιζήματα ιλύος της ανατολικής Μεσογείου (Heijs *et al.* 2005, Heijs *et al.* 2007, Heijs *et al.* 2008).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ενδείξεις ότι άλλοι βακτηριακοί σύντροφοι εκτός των SRB μετέχουν στις συντροφίες που διενεργούν AOM (Pernthaler *et al.* 2008). Συσσωματώματα που περιλάμβαναν την ANME-2c ομάδα των Archaea απομονώθηκαν και εξετάστηκαν τα Bacteria που περιλαμβάνονται σε αυτά. Αν και η μεγαλύτερο ποσοστό των Bacteria που εντοπίστηκαν, όπως αναμενόταν, ανήκε σε δύο ομάδες θεϊκοαναγωγικών δ-

Proteobacteria, βρέθηκαν επίσης μέλη των α-, β-, γ- και ε- Proteobacteria καθώς και μέλη των Planctomycetes, Bacterioidetes [ή ομάδα Cytophaga-Flavobacterium-Bacterioidetes, CFB] και άλλα Bacteria που δεν μπορούν να τοποθετηθούν στα γνωστά, μέχρι σήμερα φύλα. Ορισμένοι από τους φυλοτύπους που εντοπίστηκαν στα ιζήματα των ηφαιστειών υλός που μελετήθηκαν εμφανίζουν υψηλή ομοιότητα με τους φυλοτύπους που βρέθηκαν στις συντροφίες Bacteria-Archaea, οπότε είναι πιθανό να διαδραματίζουν αντίστοιχο ρόλο.

Πρόσφατα, οι Beal *et al.* (2009) έδειξαν ότι είναι ενεργειακά αποδοτική αλλά και δυνατή η σύζευξη της AOM με την αναγωγή Fe ή αναγωγή Mn. Ενώ, έχει δειχθεί και η δυνατότητα σύζευξη της AOM με την απονιτροποίηση (Raghoebarsing *et al.* 2006). Σε αυτούς τους τρόπους διεξαγωγής της AOM έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται διάφορες ομάδες Bacteria που περιλαμβάνουν αναγωγείς μετάλλων, όπως γ- και δ- Proteobacteria, Acidobacteria, Bacterioidetes και Verucomicrobia. Βρέθηκαν επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία Bacteria των φύλων Chloroflexi, Planctomycetes, Spirochaetes και Actinobacteria. Αρκετοί από τους φυλότυπους που ανιχνεύτηκαν στη μελέτη των Beal *et al.* (2009) έδειξαν υψηλή ομοιότητα με αντίστοιχους που προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων που αναλύθηκαν από τα ιζήματα των ηφαιστειών υλός της παρούσας εργασίας.

Η μελέτη της δομής των προκαρυωτικών βιοκοινοτήτων με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του 16S RNA γονιδίου έχει δεχτεί κριτική κυρίως λόγω της παραμονής εξωκυτταρικού DNA σε εδάφη και ιζήματα (Dell'Anno & Danovaro 2005, Pietramellara *et al.* 2009). Ωστόσο, οι μέχρι πρότινος δημοσιευμένες έρευνες έχουν δείξει

αδυναμία ενίσχυσης του εξωκυτταρικού DNA στις περισσότερες περιπτώσεις (Corinaldesi *et al.* 2005) αλλά ακόμα και όταν επιτεύχθει αυτό, μόνο σχετικά μικρά κομμάτια (<900 b) πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς (Cai *et al.* 2007, Corinaldesi *et al.* 2008). Φαίνεται επομένως ότι οι βιβλιοθήκες κλώνων που περιλαμβάνουν σχεδόν όλο το 16S rRNA γονίδιο (περίπου 1500 b) αντιπροσωπεύουν γονίδια προερχόμενα από τους ζώντες, μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας, μικροοργανισμούς των ιζημάτων.

Επιπλέον, η κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων αν και περισσότερο χρονοβόρα και δαπανηρή από τις τεχνικές ανίχνευσης μοριακών αποτυπωμάτων [fingerprinting techniques], όπως η ανάλυση μήκους πολυμορφισμού περιοριστικού θραύσματος [restriction fragment length polymorphism, RFLP] θεωρείται περισσότερο αντιπροσωπευτική της εικόνας του οικοσυστήματος, καθώς οι τεχνικές ανίχνευσης μοριακών αποτυπωμάτων, συχνά αδυνατούν να αποδώσουν τη ρεαλιστική δομή και ποικιλότητα του οικοσυστήματος και να ανιχνεύσουν αλλαγές στις βιοκοινότητες μεταξύ διαφορετικών οικοσυστημάτων (Martin *et al.* 2007, Martin & Franco 2008). Επίσης, με τις μεθόδους αυτές, δεν αποκαλύπτονται οι σπάνιοι¹³ φυλότυποι, που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε κάποια περιβάλλοντα.

Ένα σημαντικό ζήτημα στον τομέα της Οικολογίας των μικροοργανισμών αφορά την παρουσία και τη λειτουργία των σπάνιων φυλοτύπων σε ένα οικοσύστημα, που συχνά αγνοείται (Bent & Forney 2008). Αρχικά, υπήρχε

¹³φυλότυποι που αντιπροσωπεύονται (στο οικοσύστημα, στο πεδίο δειγματοληψίας ή στη βιβλιοθήκη που αναλύεται) με ένα ή δύο άτομα (/ κλώνους)

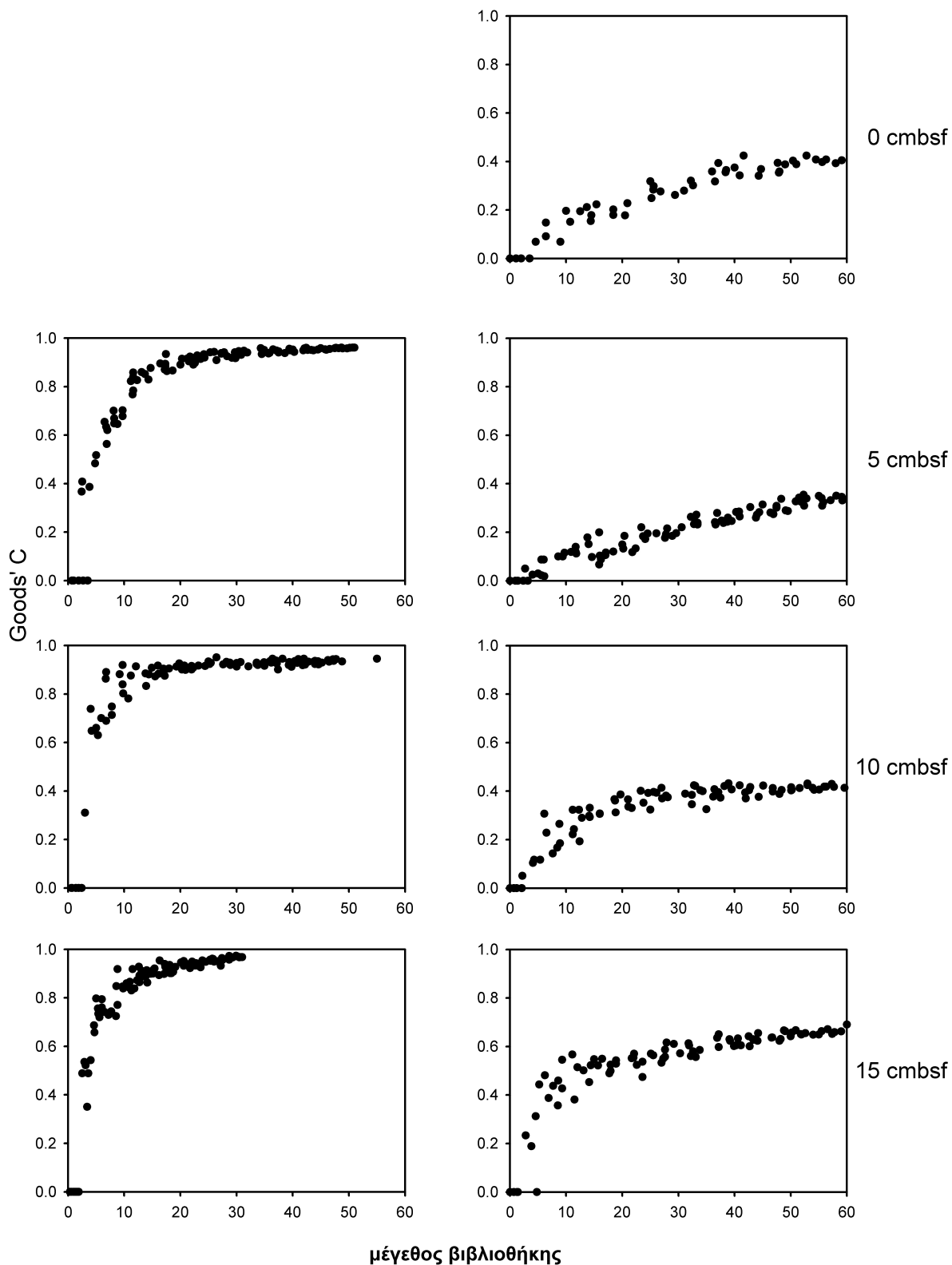
η πεποίθηση ότι οι αριθμητικά κυρίαρχοι οργανισμοί είναι υπεύθυνοι για το μεγαλύτερο μέρος της μεταβολικής ενεργότητας και της ροής ενέργειας ενός συστήματος (Tilman 1982). Όμως οι σπάνιοι φυλότυποι αντιπροσωπεύουν μία δεξαμενή γενετικής και λειτουργικής ποικιλότητας (Yachi & Loreau 1999, Nandi *et al.* 2004), αν και σε μικρό αριθμό μπορεί να κατέχουν σημαντικούς ρόλους σε ένα οικοσύστημα (Phillips *et al.* 2000, Louda & Rand 2002) και μπορούν να γίνουν αριθμητικά σημαντικοί αν αλλάξουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες.

Συνοψίζοντας, η παρουσία φυλογενετικών ομάδων των ANME σε όλους τους οριζόντες ιζήματος και των δύο ηφαιστειών ιλύος που εξετάστηκαν αποτελούν ενδείξεις ότι η αναερόβια οξείδωση του

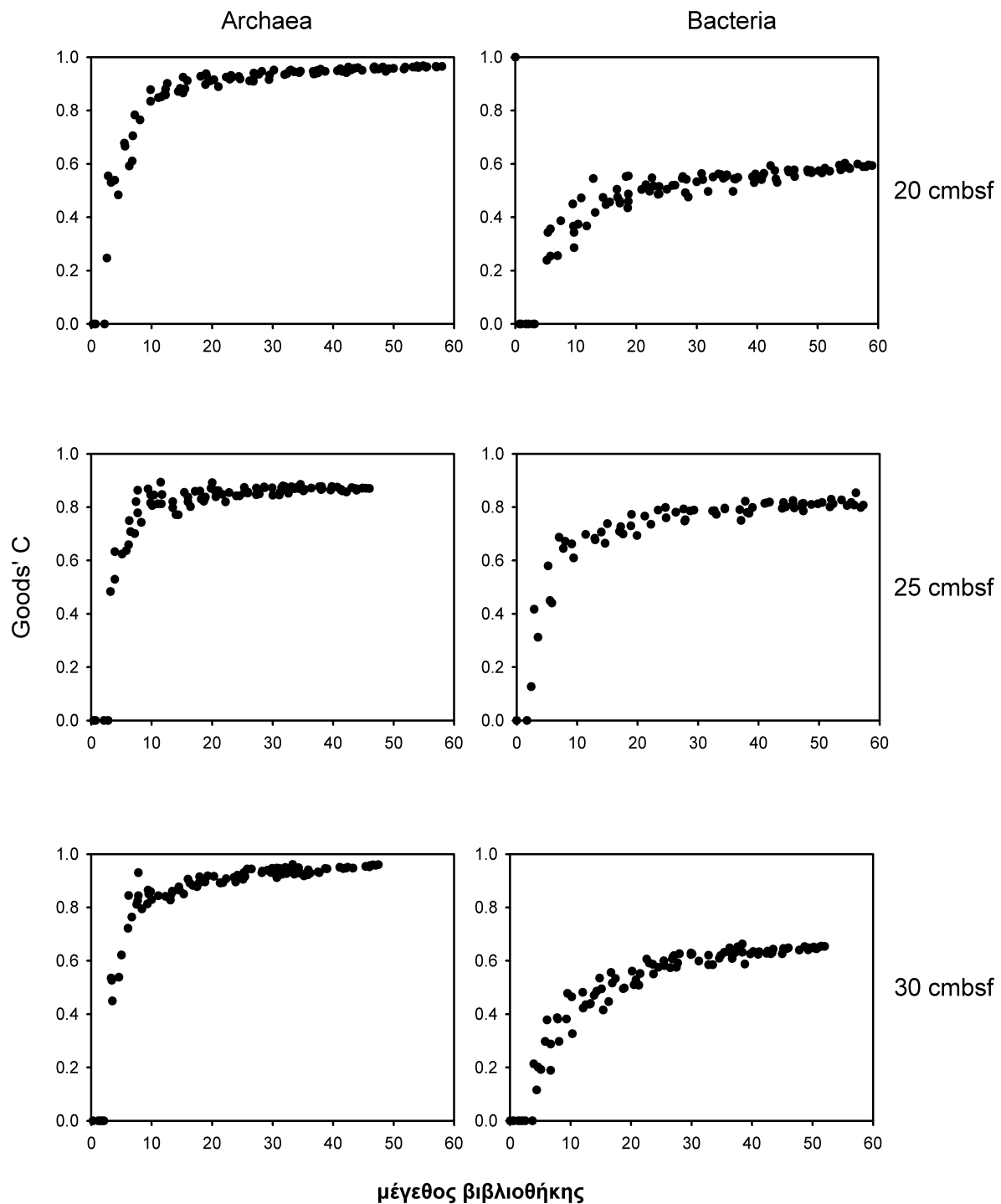
μεθανίου είναι ενεργή διεργασία στα ιζήματα αυτά. Η σύζευξη της αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου γίνεται πιθανά με τη θειική αναγωγή (κατά κύριο στους οριζόντες που επικρατούν τα SRB Bacteria, όπως τα 25 cmbsf στο Amsterdam και 5, 15 και 20 cmbsf στο Kazan MV) αλλά και με την αναγωγή ιόντων μετάλλων, όπως Fe ή Mn, σε οριζόντες που τα θειικά δεν είναι διαθέσιμα ή η σύζευξή τους με την AOM είναι ενεργειακά λιγότερο αποδοτική. Επίσης, ετερότροφοι μικροοργανισμοί που στηρίζονται μεταβολικά στην αποικοδόμηση οργανικών ουσιών ανιχνεύθηκαν, υποδηλώνοντας ότι το μεθάνιο δεν είναι η αποκλειστική πηγή ενέργειας που τροφοδοτεί τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στα ηφαιστεια ιλύος που μελετήθηκαν.

Archaea

Bacteria

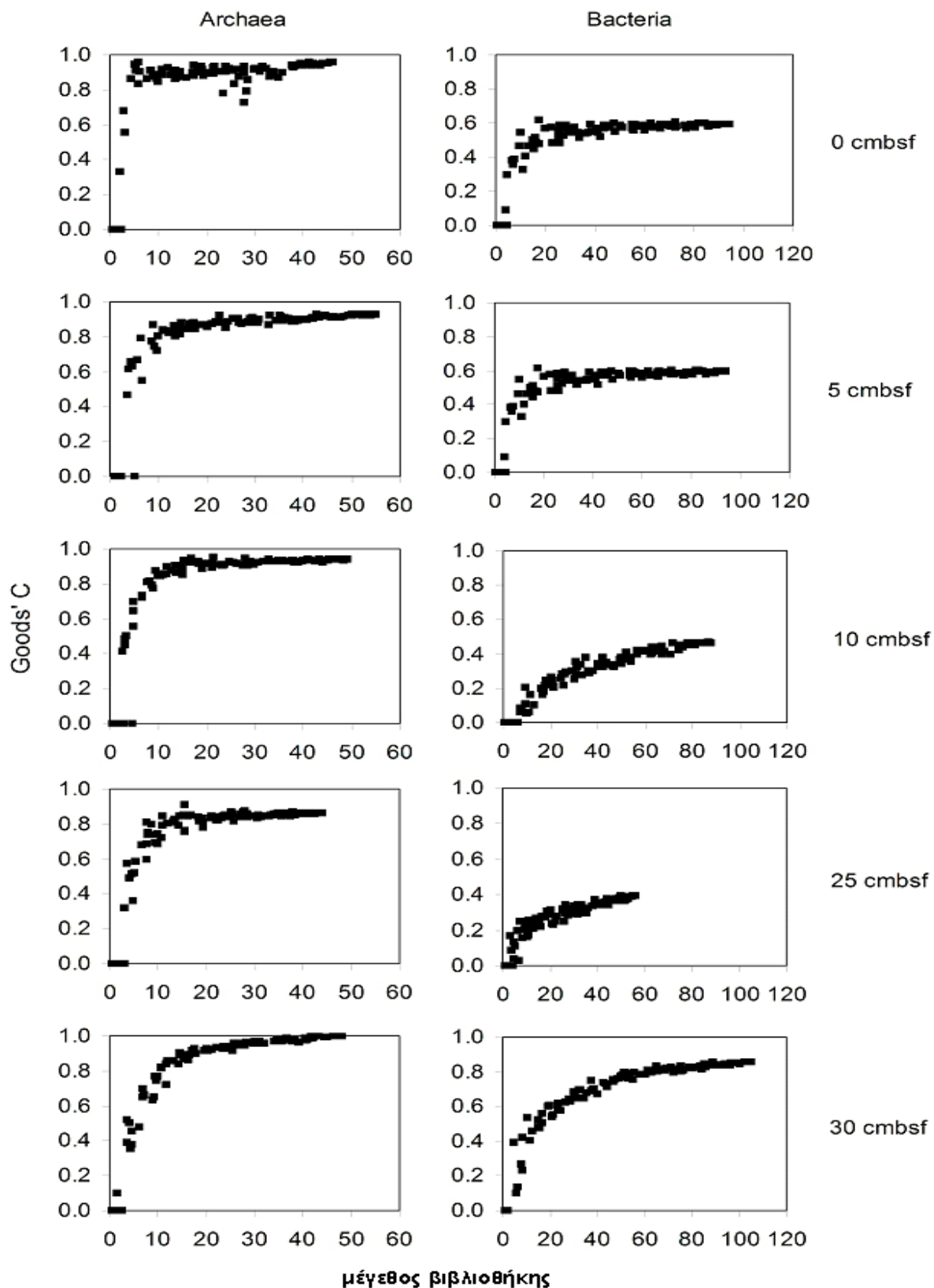


a



b

Σχήμα 3.9 Η κάλυψη των βιβλιοθηκών κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Archaea και Bacteria (βασισμένο στον εκτιμητή κάλυψης Good's C) των οριζόντων ιζήματος 0, 5, 10, 15 (a) και 20, 25, 30 cmbsf (b) του ηφαιστείου ιλύος Amsterdam



Σχήμα 3.10 Η κάλυψη των βιβλιοθηκών κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Archaea και Bacteria (βασισμένο στον εκτιμητή κάλυψης Good's C) των οριζόντων ιζήματος 0, 5, 10, 25 και 30 cmbsf του ηφαιστείου ιλύος Kazan

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ

4.1 ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Η μελέτη της βιοποικιλότητας (σύντμηση του όρου βιολογική ποικιλότητα) έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών γιατί εκτός από την ενδογενή και τη χρηστική της αξία (Gaston & Spicer 2003), σχετίζεται με τα περισσότερα καίρια ζητήματα της Βιολογίας, ιδιαίτερα στον τομέα αυτής που μελετάει τα οικοσυστήματα και το περιβάλλον.

4.1.1 Μεθοδολογία μελέτης της βιοποικιλότητας

Η εύρεση της κατάλληλης μεθοδολογίας για να εκτιμηθεί ποσοτικά η βιοποικιλότητα παραμένει άλυτο πρόβλημα (Maddox 1994). Η έννοια της βιοποικιλότητας είναι χρήσιμη για πολλούς λόγους, καθώς μας παρέχει μια πολύτιμη όσο και σύντομη έκφραση για αυτό που έχουμε αντιληφθεί ότι αποτελεί εξαιρετικά πολύπλοκο και σημαντικό φαινόμενο. Προκειμένου όμως η βιοποικιλότητα να έχει ευρύτερη εφαρμογή, χρειάζεται να μπορέσουμε να την μετρήσουμε και να την περιγράψουμε με ποσοτικούς όρους. Σε αυτήν την περίπτωση μπορούν να τεθούν κάποια θεμελιώδη ερωτήματα που σχετίζονται με την αλλαγή της βιοποικιλότητας, τις συνθήκες που την καθορίζουν, τον τρόπο διατήρησης της και το πώς έχει αλλάξει μέσα στο χρόνο. Πολλές έρευνες εστιάζονται σε περιοχές - οικοσυστήματα υψηλής βιοποικιλότητας ή αλλιώς «θερμά σημεία» βιοποικιλότητας, χωρίς όμως προς το παρόν να υπάρχει στο πεδίο της Οικολογίας των μικροοργανισμών σαφής ορισμός των

ιδιοτήτων που χαρακτηρίζουν ένα οικοσύστημα ως οικοσύστημα υψηλής βιολογικής προτεραιότητας.

Η ποικιλότητα μίας βιοκοινότητας καθορίζεται τόσο από τον αριθμό των ειδών όσο και από τη σχετική αφθονία τους, δηλαδή την κατανομή του συνολικού αριθμού των ατόμων ανάμεσα στα είδη της συγκεκριμένης βιοκοινότητας. Στην οικολογία, οι περισσότερες μελέτες ταυτίζουν την ποικιλότητα με τον αριθμό των ειδών. Όμως ο αριθμός των ειδών από μόνος του, δεν μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά τη δομή της κάθε βιοκοινότητας, μια που ο αριθμός των ατόμων μέσα σε κάθε είδος διαφέρει. Αυτός ήταν και ο λόγος που ώθησε στην ανάπτυξη δεικτών, οι οποίοι λαμβάνουν υπ' όψιν τους και το βαθμό της ισομερούς κατανομής.

Συνολικά, στη θαλάσσια οικολογία χρησιμοποιείται σήμερα μια πληθώρα δεικτών ποικιλότητας, από τους οποίους άλλοι δίνουν μεγαλύτερο βάρος στον αριθμό των ειδών και άλλοι στο βαθμό της ισομερούς κατανομής αυτών. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλές φορές διαφορές στις κατατάξεις των δειγμάτων, ανάλογα με το δείκτη που χρησιμοποιείται. Στο πεδίο της μικροβιακής οικολογίας η ποικιλότητα και η μεθοδολογία εκτίμησης αυτής αποτελούν κεντρικά ζητήματα. Η προσέγγιση μέσω των βιβλιοθηκών κλώνων, αν και δέχεται κριτική (Crosby & Criddle 2003, Curtis & Sloan 2004, Bent & Forney 2008) είναι αυτή που γνωρίζει την ευρύτερη εφαρμογή μέχρι σήμερα.

4.1.2 Δείκτες βιοποικιλότητας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείκτες και των δύο κατηγοριών. Ο Shannon-Wiener (H') δίνει μεγαλύτερη βαρύτητα στον αριθμό των ειδών ενώ ο Pielou's (J') δίνει μεγαλύτερο βάρος στο βαθμό της ισομερούς κατανομής. Οι αλγόριθμοι των δεικτών αυτών αρχικά εφαρμόστηκαν σε λίστες ειδών αλλά για τις ανάγκες της μικροβιακής οικολογίας χρησιμοποιούνται αντίστοιχα λίστες φυλοτύπων (βλέπε κεφάλαιο 3). Ανάλογα με το κριτήριο ομοιότητας των αλληλουχιών για τον καθορισμό των φυλοτύπων που χρησιμοποιεί ο κάθε ερευνητής διαφοροποιείται ο αριθμός τους και η σχετική αφθονία τους και είναι ένας παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν επιχειρούνται συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ερευνών.

Ένα σημαντικό εργαλείο τόσο για τη σύγκριση των βιοκοινοτήτων ιδιαίτερα όταν υπάρχει χωρική ή χρονική σύνδεση μεταξύ τους είναι η πολυμεταβλητή ανάλυση, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει και περιβαλλοντικές παραμέτρους, όταν είναι διαθέσιμες.

Τα δεδομένα μιας βιοκοινότητας έχουν τη μορφή πολυδιάστατων μεταβλητών. Η παρουσία ενός οργανισμού αντικατοπτρίζει ουσιαστικά ένα σύνολο παραμέτρων που αφορούν τη σύσταση της βιοκοινότητας αλλά και το δειγματοληπτικό πεδίο όπως τη δυναμική του οικοσυστήματος, τις διατροφικές σχέσεις, τη θερμοκρασία κτλ. Η κατανοητή απεικόνιση τους λοιπόν απαιτεί τη μαθηματική του επεξεργασία. Τέτοιες μαθηματικές επεξεργασίες είναι η ανάλυση ομαδοποίησης [classification], η οποία οδηγεί στην απεικόνιση με τη μορφή του δενδρογράμματος και η διευθέτηση [ordination], που οδηγεί σε δυσδιάστατη απεικόνιση καρτεσιανών συντεταγμένων.

Οι περισσότερες από αυτές τις αναλύσεις βασίζονται στον υπολογισμό της ομοιότητας των δεδομένων αφθονίας ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα. Η ομοιότητα αυτή υπολογίζεται συνήθως με την κατασκευή μήτρας ομοιότητας, στην οποία περιλαμβάνονται όλα τα υπό εξέταση δείγματα. Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι δείκτες ομοιότητας, ο πιο κατάλληλος όμως για δεδομένα μικροβιακής οικολογίας είναι ο δείκτης ομοιότητας Morisita καθώς είναι ανεξάρτητος του μεγέθους του δείγματος (Wolda 1981).

Η ανάλυση ομαδοποίησης χρησιμοποιεί τη μήτρα ομοιότητας για να κατατάξει τα δείγματα σε ομάδες έτσι ώστε σε κάθε μία από αυτές να συνυπάρχουν τα δείγματα με τη μεγαλύτερη ομοιότητα. Το αποτέλεσμα της μεθόδου απεικονίζεται από ένα διάγραμμα (δενδρόγραμμα) όπου ο ένας άξονας αντιπροσωπεύει το βαθμό ομοιότητας μεταξύ των ομάδων και ο άλλος άξονας περιλαμβάνει όλα τα δείγματα που συμμετέχουν στην ανάλυση.

Ο υπολογισμός των δεικτών ποικιλότητας αλλά και η εφαρμογή της ανάλυσης ομαδοποίησης σε περιβαλλοντικά δείγματα με τη χρήση βιβλιοθηκών κλώνων βασίζεται σε ορισμένες παραδοχές μεταξύ των επιστημόνων. Η πιο βασική είναι ότι οι βιβλιοθήκες κλώνων αντικατοπτρίζουν τη σύσταση των φυλοτύπων των δειγμάτων από τα οποία προήλθαν. Επίσης, κοινή πειραματική προσέγγιση που περιλαμβάνει κοινό πρωτόκολλο εκχύλισης DNA, κοινές συνθήκες και τα ίδια ζεύγη εκκινητών στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για όλα τα δείγματα που αναλύονται είναι σημαντική προϋπόθεση για να εφαρμοστεί μετα-αναλυτική προσέγγιση στα πειραματικά αποτελέσματα και να μπορούν να πραγματοποιηθούν συγκρίσεις

στους δείκτες και ανάλυση ομαδοποίησης (Hong *et al.* 2006).

Τέλος, στις βιβλιοθήκες κλώνων μικροβιακών κοινοτήτων συχνά, λόγω κυρίως του κόστους σε χρόνο και χρήματα, υπάρχει το πρόβλημα της ελλιπούς δειγματοληψίας (Kemp & Aller 2003, Bent & Forney 2008). Ένας ικανοποιητικός εκτιμητής κάλυψης ή μια καμπύλη επιπέδου προσπάθειας¹⁴ που προσεγγίζει σε πλάτωμα ακόμα και αν ο εκτιμητής κάλυψης είναι σχετικά χαμηλός θεωρούνται ως ικανά για να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα (Hill *et al.* 2003, Kemp & Aller 2004, Aller & Kemp 2008). Ωστόσο, θεωρίες και όροι της κλασικής οικολογίας, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή στη μικροβιακή οικολογία (Hong *et al.* 2006, Bent & Forney 2008).

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τον υπολογισμό των δεικτών χρησιμοποιήθηκαν οι πίνακες φυλοτύπων και φυλογενετικών ομάδων που προέκυψαν από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου 3.

4.2.1 Δείκτες Shannon-Wiener και Pielou

Ο δείκτης Shannon-Wiener index H' (Shannon 1949) που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μέτρησης της ποικιλότητας υπολογίζεται από την εξίσωση $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln p_i$, όπου S είναι ο συνολικός αριθμός των φυλοτύπων ενός δείγματος και p_i η σχετική αφθονία του κάθε φυλοτύπου i σε αυτό το δείγμα. Ο δείκτης ισοκατανομής J (Shannon 1949, Pielou 1969) υπολογίστηκε με την εξίσωση $J = H' / \ln S$.

¹⁴ αριθμός φυλοτύπων που ταυτοποιούνται συναρτήσει του αριθμού των κλώνων που αλληλουχούνται

4.2.2 Ανάλυση ομαδοποίησης

Η ανάλυση ομαδοποίησης βασίστηκε σε μήτρα ομοιότητας που προέκυψε με τη χρήση του αλγορίθμου Morisita στο πρόγραμμα PAST (Hammer *et al.* 2001). Η εξίσωση με την οποία υπολογίζεται η ομοιότητα μεταξύ δύο δειγμάτων j και k είναι η εξής:

$$Morisita_{jk} = \frac{2 \sum_{i=1}^s (n_{ij} n_{ik})}{(\lambda_1 + \lambda_2) \sum_{i=1}^s n_{ij} \sum_{i=1}^s n_{ik}}, \text{ όπου}$$

$$\lambda_1 = \frac{\sum_{i=1}^s (n_{ij} (n_{ij} - 1))}{\sum_{i=1}^s n_{ij} (\sum_{i=1}^s n_{ij} - 1)} \text{ και}$$

$$\lambda_2 = \frac{\sum_{i=1}^s (n_{ik} (n_{ik} - 1))}{\sum_{i=1}^s n_{ik} (\sum_{i=1}^s n_{ij} - 1)}, \text{ } n_{ij} \text{ είναι ο αριθμός}$$

ατόμων (κλώνων) του φυλοτύπου i στο δείγμα j και n_{ik} ο αριθμός ατόμων (κλώνων) του φυλοτύπου i στο δείγμα k (Morisita 1959).

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1 Δείκτες βιοποικιλότητας

Ο δείκτης ποικιλότητας Shannon-Wiener H σε όλα τα βάθη που εξετάστηκαν και για τα δύο ηφαίστεια ιλύος ήταν υψηλότερος για τις κοινότητες Bacteria σε σχέση με αυτές των Archaea, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.1 και τον Πίνακα 4.2. Για τα Archaea στο Amsterdam MV ο H κυμάνθηκε από 0,99 ως 1,72, τιμές που χαρακτηρίζονται γενικά χαμηλές. Αντίστοιχα χαμηλές βρέθηκαν οι τιμές στο Kazan MV και διακυμάνθηκαν από 0,56 ως 1,73. Τα δύο ηφαίστεια ιλύος εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο στην κατακόρυφη μεταβολή του H (Πίνακες 4.1 και 4.2). Στο Amsterdam MV, με δεδομένη την απουσία τιμών από τον επιφανειακό ορίζοντα, η χαμηλότερη τιμή παρουσιάστηκε στο βαθύτερο ορίζοντα που μελετήθηκε, στα 30 cmbsf και η υψηλότερη στα 5 cmbsf. Οι ενδιάμεσοι ορίζοντες εμφάνισαν ενδιάμεσες τιμές ποικιλότητας, γύρω στο 1,4. Στο Kazan MV, η

Πίνακας 4.1 Συγκριτικός πίνακας του αριθμού των κλώνων που αναλύθηκαν [n] και των φυλοτύπων [S] που βρέθηκαν σε κάθε βιβλιοθήκη κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Archaea στα βάθη (cmbsf) που μελετήθηκαν καθώς και οι τιμές των δεικτών Shannon-Wiener [H] και Pielou [J] που υπολογίστηκαν για κάθε μία από τις βιβλιοθήκες

ARCHAEA									
Amsterdam MV					Kazan MV				
Βάθος	n	S	H'	J	n	S	H'	J	
0					46	5	0,56	0,348	
5	51	8	1,72	0,829	55	9	1,56	0,711	
10	55	7	1,26	0,647	49	7	1,41	0,726	
15	33	6	1,38	0,772	54	2	0,64	0,918	
20	58	7	1,48	0,761	49	2	0,66	0,949	
25	46	9	1,41	0,642	44	10	1,62	0,705	
30	48	6	0,99	0,554	48	7	1,73	0,890	
	291	43			345	42			

χαμηλότερη τιμή παρουσιάστηκε στην επιφάνεια, ενώ πολύ χαμηλές ήταν και οι τιμές στα 15 και 20 cmbsf. Η υψηλότερη τιμή σε αυτό τον πυρήνα βρέθηκε στο βαθύτερο ορίζοντα, ενώ στους υπόλοιπους ορίζοντες κυμάνθηκαν γύρω στο 1,5.

Ο δείκτης ισοκατανομής Pielou, J στο Amsterdam MV για τις βιοκοινότητες των Archaea ακολούθησε αντίστοιχο κατακόρυφο πρότυπο μεταβολής με αυτό του H σε αυτό το ηφαίστειο υλός. Η χαμηλότερη τιμή 0,554 σημειώθηκε και πάλι στα 30 cmbsf ενώ η μεγαλύτερη, 0,829, στον ορίζοντα των 5 cmbsf.

Στο Kazan MV η χαμηλότερη τιμή J ακολούθησε τη χαμηλότερη τιμή H αλλά οι υψηλότερες τιμές 0,949 και 0,918 παρουσιάστηκαν στα 20 και 25 cmbsf, όπου ο H ήταν γενικά χαμηλός.

Οι τιμές της ποικιλότητας Shannon, H για τις βιοκοινότητες των Bacteria κυμάνθηκαν από 1,92 ως 4,03 στο Amsterdam MV και από 1,49 ως 3,90 στο Kazan MV. Στο Amsterdam MV η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στον επιφανειακό ορίζοντα ενώ τη χαμηλότερη τιμή στα 25 cmbsf. Ενδιάμεσες τιμές H, κοντά στο 2,8, παρουσιάστηκαν στα βάθη 15, 20 και 30 cmbsf ενώ σχετικά υψηλές

Πίνακας 4.2 Συγκριτικός πίνακας του αριθμού των κλώνων που αναλύθηκαν [n] και των φυλοτύπων [S] που βρέθηκαν σε κάθε βιβλιοθήκη κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Bacteria στα βάθη (cmbsf) που μελετήθηκαν καθώς και οι τιμές των δεικτών Shannon-Wiener [H] και Pielou [J] που υπολογίστηκαν για κάθε μία από τις βιβλιοθήκες

BACTERIA									
Amsterdam MV					Kazan MV				
Βάθος	n	S	H'	J	n	S	H'	J	
0	121	73	4,03	0,940	68	50	3,81	0,974	
5	67	52	3,85	0,974	91	41	2,91	0,782	
10	71	46	3,45	0,900	89	61	3,90	0,950	
15	69	30	2,71	0,796	69	6	1,57	0,877	
20	59	30	2,83	0,831	69	6	1,49	0,832	
25	87	20	1,92	0,639	53	39	3,40	0,927	
30	52	25	2,83	0,879	76	28	2,70	0,812	
	526	276			515	231			

είναι οι τιμές στα 5 cmbsf (3,85) και στα 10 cmbsf (3,45).

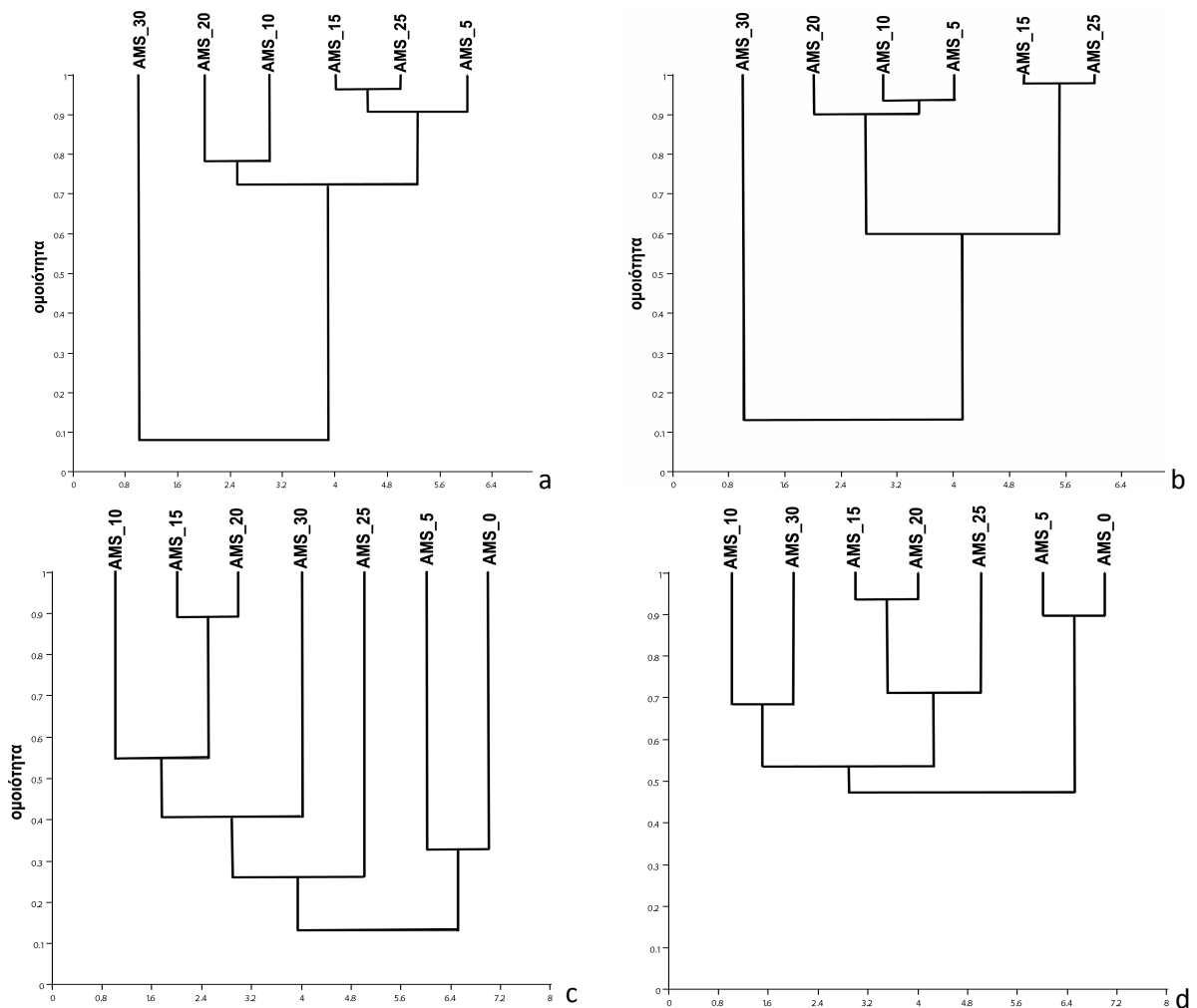
Στο Kazan MV η υψηλότερη τιμή H βρέθηκε στα 10 cmbsf αλλά εξίσου υψηλή ήταν η τιμή του H και στον επιφανειακό ορίζοντα (3,81) και στα 25 cmbsf (3,40). Η χαμηλότερη τιμή παρουσιάστηκε στα 20 cmbsf για το Kazan MV, ακολουθούμενη από τον ορίζοντα των 15 cmbsf. Οι υπόλοιποι οριζόντες στα 5 και 30 cmbsf εμφάνισαν τιμές γύρω στο 2,8.

Ο δείκτης ισοκατανομής Pielou, J ακολούθησε στο Amsterdam και για τα Bacteria παρόμοια κατακόρυφη κατανομή με τον H. Παρουσίασε υψηλές τιμές στα 0, 5, 10 cmbsf

(πάνω από 0,9) όπου και ο H ήταν υψηλός και πήρε τη χαμηλότερη τιμή (0,639) στα 25 cmbsf. Στο Kazan MV δε φάνηκε κάποιο πρότυπο κατανομής του J. Η μεγαλύτερη τιμή βρέθηκε στην επιφάνεια (0,974) και η χαμηλότερη στον αμέσως βαθύτερο ορίζοντα των 5 cmbsf.

4.3.2 Ανάλυση Ομαδοποίησης

Ο δείκτης ομοιότητας Morisita και η ανάλυση ομαδοποίησης εφαρμόστηκε τόσο για το επίπεδο του φυλοτύπου όσο και για το

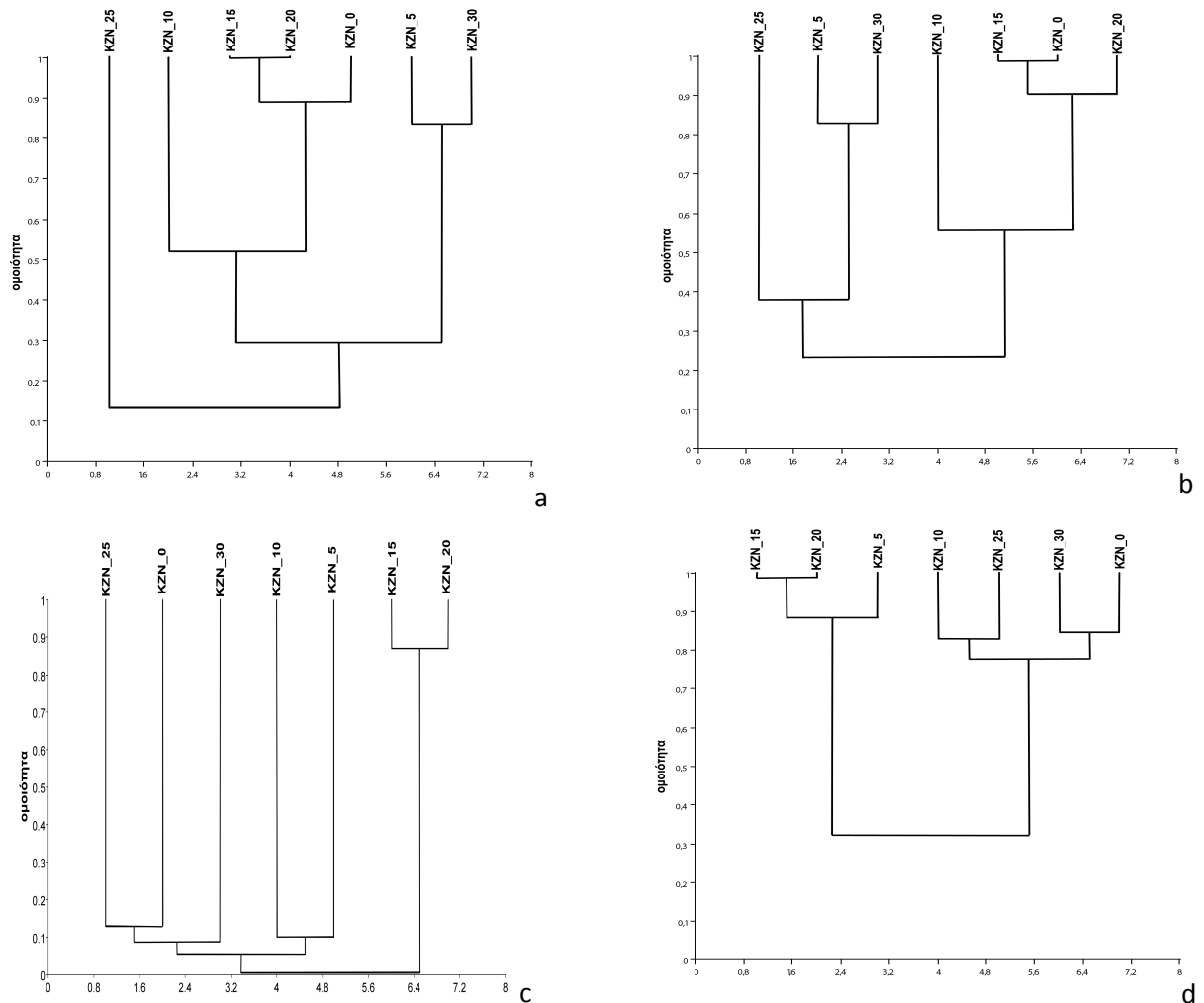


Σχήμα 4.1 Ανάλυση ομαδοποίησης με τη χρήση του δείκτη ομοιότητας Morisita για τις βιοκοινότητες των Archaea σε επίπεδο φυλοτύπου a. και φυλογενετικής ομάδας b. και για τις βιοκοινότητες των Bacteria σε επίπεδο φυλοτύπου c. και φυλογενετικής ομάδας d. στο Amsterdam MV

επίπεδο της φυλογενετικής ομάδας. Η εφαρμογή της ανάλυσης ομαδοποίησης στο Amsterdam MV, έδειξε ότι βιοκοινότητες των Archaea από όλους τους ορίζοντες πλην των 30 cmbsf εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους, σε επίπεδο ομοιότητας της τάξης του 0,7 όταν εξετάζεται η σύσταση των βιοκοινοτήτων με βάση τους φυλοτύπους και με επίπεδο ομοιότητας 0,6 όταν συγκρίνονται οι φυλογενετικές ομάδες (Σχήμα 4.1a και 4.1b αντίστοιχα). Και με τους δύο τρόπους προσέγγισης οι ορίζοντες 15 και 25 cmbsf σχηματίζουν ομάδα, υψηλού βαθμού ομοιότητας (>0,9). Ομάδα, επίσης δημιουργούν και οι ορίζοντες 10 και 20 cmbsf (~ 0,8 όταν

εξετάζονται οι φυλότυποι και 0,9 όταν εξετάζονται οι φυλογενετικές ομάδες), ενώ τα 5 cmbsf ομαδοποιούνται διαφορετικά με τις δύο προσεγγίσεις.

Στο ίδιο ηφαίστειο ιλύος, οι κοινότητες των Bacteria αποκάλυψαν διαφορετικά πρότυπα ομοιότητας μεταξύ των οριζόντων ιζήματος που εξετάστηκαν. Όταν εφαρμόστηκε ο δείκτης σε επίπεδο φυλοτύπου (Σχήμα 4.1c), μόνο οι ορίζοντες των 15 και 20 cmbsf παρουσίασαν σημαντική ομοιότητα (~0,9). Τα 10 cmbsf εμφάνισαν μικρή ομοιότητα με αυτούς τους ορίζοντες (~0,55) αλλά όλοι οι υπόλοιποι ορίζοντες είχαν μικρή μόνο ομοιότητα με αυτούς και μεταξύ τους (<0,4).

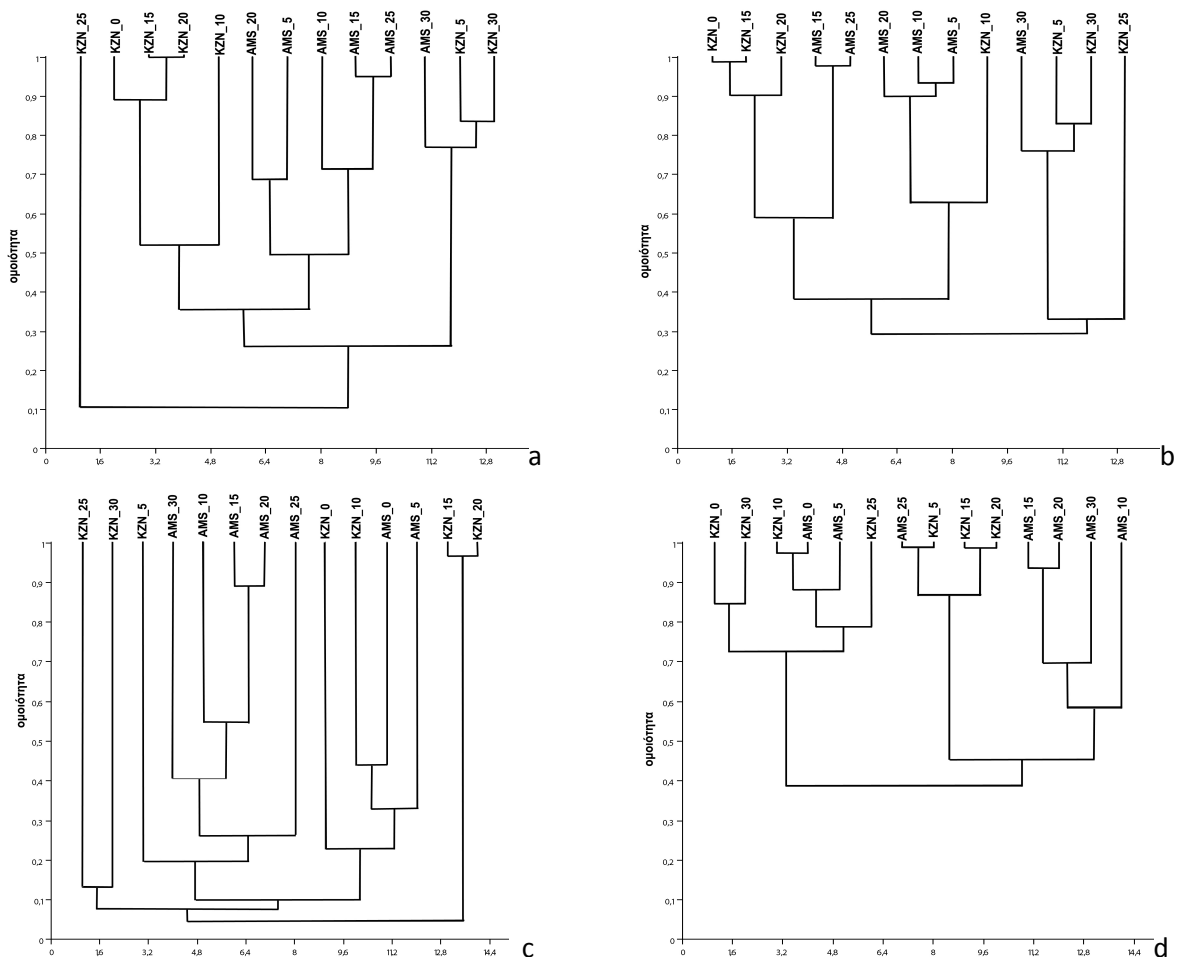


Σχήμα 4.2 Ανάλυση ομαδοποίησης με τη χρήση του δείκτη ομοιότητας Morisita για τις βιοκοινότητες των Archaea σε επίπεδο φυλοτύπου a. και φυλογενετικής ομάδας b. και για τις βιοκοινότητες των Bacteria σε επίπεδο φυλοτύπου c. και φυλογενετικής ομάδας d. στο Kazan MV

Αναλύοντας τις φυλογενετικές ομάδες της κάθε βιοκοινότητας των Bacteria, ο βαθμός ομοιότητας φάνηκε να αυξάνει (Σχήμα 4.1c). Η ομαδοποίηση των 15 και 20 cmbsf εξακολούθησε να είναι ισχυρή (ομοιότητα >0,9) αλλά η ομάδα αυτή προσεγγίστηκε και από τον ορίζοντα των 25 cmbsf (0,7). Επίσης, σχηματίστηκαν ομάδες μεταξύ των 0 και 5 cmbsf (0,85) και των 10 με τα 30 cmbsf (0,7). Στο Kazan MV για τα Archaea, τόσο στο επίπεδο του φυλοτύπου όσο και στο επίπεδο της φυλογενετικής ομάδας δημιουργήθηκαν παρόμοιες ομαδοποιήσεις (Σχήμα 4.2a και 4.2b). Ο επιφανειακός ορίζοντα μαζί με αυτόν από τα 15 και τα 20 cmbsf αποτελούσαν μία

ομάδα με δημιουργήθηκε από τα 5 και 30 cmbsf (με επίπεδο ομοιότητας ~0,8). Τα 25 cmbsf έχουν μια αρκετά διαφορετική κοινότητα Archaea από όλους τους υπόλοιπους ορίζοντες.

Όσον αφορά, τις κοινότητες των Bacteria, παρουσιάστηκε ξανά η ομαδοποίηση των 15 και 20 cmbsf (σε επίπεδο >0,9) και με τις δύο προσεγγίσεις, φυλοτύπου και φυλογενετικής ομάδας (Σχήμα 4.2c και 4.2d, αντίστοιχα). Ωστόσο, όταν αναλύθηκαν οι ομοιότητες των κοινοτήτων με βάση το φυλότυπο όλοι οι υπόλοιποι ορίζοντες παρουσίασαν χαμηλό επίπεδο ομοιότητας (<0,3) και, ουσιαστικά, δεν μπόρεσαν να ομαδοποιηθούν.



Σχήμα 4.3 Ανάλυση ομαδοποίησης με τη χρήση του δείκτη ομοιότητας Morisita για τις βιοκοινότητες των Archaea σε επίπεδο φυλοτύπου a. και φυλογενετικής ομάδας b. και για τις βιοκοινότητες των Bacteria σε επίπεδο φυλοτύπου c. και φυλογενετικής ομάδας d. στο Amsterdam και Kazan MV

Με τη χρήση των φυλογενετικών ομάδων στις κοινότητες Bacteria του Kazan MV αυξήθηκε, όπως και στην περίπτωση του Amsterdam MV, ο βαθμός ομοιότητας των οριζόντων που εξετάστηκαν. Τα 5 cmbsf παρουσίασαν σημαντική ομοιότητα (0,85) με τα 15 και 20 cmbsf. Οι υπόλοιποι ορίζοντες, 10, 25, 30, 0 cmbsf σχημάτισαν μία ομάδα ικανοποιητικής ομοιότητας (0,7).

Η ανάλυση ομαδοποίησης εφαρμόστηκε και για τη σύγκριση των δύο ηφαιστειών ιλύος που μελετήθηκαν (Σχήμα 4.3). Στο επίπεδο των φυλοτύπων τα δύο ηφαίστεια ιλύος δεν παρουσίασαν σημαντική ομοιότητα (<0,4) όταν αναλύθηκαν συγκρίθηκαν οι κοινότητες των Bacteria ενώ για τα Archaea ομαδοποιήθηκαν (με επίπεδο ομοιότητας 0,7) ο ορίζοντας ιζήματος των 30 cmbsf του Amsterdam MV με την ομάδα των 0/30 cmbsf του Kazan MV. Όταν στην ανάλυση ομαδοποίησης συγκρίθηκαν δεδομένα φυλογενετικών ομάδων, οι ομοιότητες που προέκυψαν από τις κοινότητες των Bacteria τουλάχιστον ήταν αρκετές. Θα πρέπει ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά να ερμηνευτούν με προσοχή, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή την εργασία ο δείκτης H για τα Archaea εμφάνισε χαμηλότερες τιμές σε σχέση με προηγούμενη έρευνα (Heijs *et al.* 2008) στα ίδια ηφαίστεια ιλύος¹⁵ αλλά και άλλα ηφαίστεια ιλύος της ανατολικής Μεσογείου (Urania, Napoli και Milano MV). Στην έρευνα αυτή το χαμηλότερο κριτήριο ομοιότητας φυλοτύπου (97%) ελάττωσε πιθανά το

¹⁵ οι θέσεις δειγματοληψίας σε αυτή την έρευνα βρίσκονται σε απόσταση, σύμφωνα με τις δημοσιευμένες συντεταγμένες, περίπου 30m στην περίπτωση του Kazan MV και περίπου 500m για το Amsterdam MV

συνολικό αριθμό φυλοτύπων και τις τιμές ποικιλότητας αλλά, αντίθετα, το μεγάλο εύρος του οριζοντα ιζήματος από το οποίο έγινε η εκχύλιση του γενετικού υλικού (από 6 ως 16cm, σε αντίθεση με τα περίπου 2 cm που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος αυτής της διατριβής) οδήγησε στην αύξηση του δείκτη της ποικιλότητας. Οι αντίστοιχες τιμές για τα Bacteria ήταν επίσης γενικά χαμηλότερες σε αυτή την εργασία σε σύγκριση με αυτή των Heijs *et al.* (2008).

Σε όλους τους ορίζοντες ιζήματος η ποικιλότητα των Bacteria εμφανίστηκε υψηλότερη από αυτή των Archaea και αυτή η τάση φαίνεται να ισχύει επίσης σε ιζήματα μεθανιοϋδριτών (Mills *et al.* 2005), ψυχρές αναβλύσεις (Reed *et al.* 2006), ηφαίστεια ιλύος (Heijs *et al.* 2008), ζώνες μετάβασης μεθανίου-θεικών (Harrison *et al.* 2009) και πιθανόν γενικότερα σε όλα τα περιβάλλοντα που σχετίζονται με το μεθάνιο (Lanoil *et al.* 2001, Aloisi *et al.* 2002, Teske *et al.* 2002, Mills *et al.* 2003, Nauhaus *et al.* 2005, Lloyd *et al.* 2006, Lösekann *et al.* 2007), τουλάχιστον όπως προκύπτει από τον αριθμό των φυλοτύπων που εμφανίζονται για τις περιπτώσεις που δεν έχουν υπολογιστεί δείκτες ποικιλότητας.

Δεν παρατηρήθηκε κοινό πρότυπο μεταβολής των δεικτών ποικιλότητας μεταξύ των δύο ηφαιστειών ούτε για τα Bacteria ούτε για τα Archaea. Ενώ και για κάθε ένα από τα ηφαίστεια ιλύος η αλλαγή με το βάθος των δεικτών ποικιλότητας των Archaea δεν ακολουθεί αυτή των Bacteria, γεγονός που έχει παρατηρηθεί σε εργασίες που εξετάζουν την κατακόρυφη κατανομή της ποικιλότητας σε ιζήματα (Reed *et al.* 2006, Heijs *et al.* 2008, Harrison *et al.* 2009).

Οι Aller & Kemp (2008) υποστήριξαν ότι οι διαφορές στην ποικιλότητα αντανακλούν διαφορές στον οικολογικό ρόλο των Archaea

και των Bacteria, και κυρίως στη χρήση των διαθέσιμων πηγών ενέργειας και της προσαρμογής στην ενεργειακή ένταση (energy stress) (Valentine 2007). Για τα μεθανιότροφα Archaea, τόσο περιβαλλοντικά και εργαστηριακά δεδομένα όσο και δεδομένα που προέκυψαν μέσω μοντέλων υποστηρίζουν ότι αυτός ο τρόπος αύξησης αποδίδει χαμηλά ποσά ενέργειας και συνήθως λαμβάνει χώρα σε εξαιρετικά χαμηλούς ρυθμούς (Hoehler *et al.* 1994, Valentine & Reeburgh 2000, D'Hondt *et al.* 2002, Nauhaus *et al.* 2002, Girguis *et al.* 2005).

Η Valentine (2007) υποστηρίζει ότι τα Archaea έχουν προσαρμοστεί σε παρατεταμένη (χρόνια) ενεργειακή ένταση και οι μηχανισμοί που διαθέτουν για την εξοικονόμηση ενέργειας τους επιτρέπει να διαβιούν σε περιβάλλοντα όπου η διαθεσιμότητα ενέργειας μπορεί να μεταβάλλεται (π.χ. η ροή και η συγκέντρωση του μεθανίου) και για το λόγο αυτό λίγοι φυλότυποι κυριαρχούν. Αντίθετα, στα Bacteria η συνύπαρξη πολλών φυλοτύπων, αυτότροφου και ετερότροφου τρόπου ζωής έχει ως αποτέλεσμα την εκμετάλλευση όλων των διαθέσιμων ενεργειακών πηγών. Επίσης, πιθανή μικρότερη φυσιολογική ευελιξία των Archaea έχει προταθεί ως μηχανισμός που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μικρότερη ποικιλότητα των Archaea σε σχέση με την αντίστοιχη των Bacteria στο ίδιο περιβάλλον (Aller & Kemp 2008).

Ορίζοντες που παρουσιάζουν τοπικό ελάχιστο στην ποικιλότητα τόσο των Archaea όσο και των Βακτηριών, όπως τα 15 και 20 cmbsf στο Kazan MV, πιθανότατα αντικατοπτρίζουν ζώνες, όπου μία ενεργειακά αποδοτική διεργασία κυριαρχεί οδηγώντας στην επικράτηση των αντίστοιχων φυλοτύπων που εμπλέκονται σε αυτή. Στη συγκεκριμένη

περίπτωση, η αναερόβια οξείδωση του μεθανίου συζευγμένη με τη θεική αναγωγή.

Οι τιμές του δείκτη ισοκατανομής J ακολούθησαν, σε γενικές γραμμές, τις τιμές του δείκτη ποικιλότητας για τα Bacteria και ήταν υψηλές (>0,78) γεγονός που υποδηλώνει ότι όλοι οι φυλότυποι είχαν περίπου την ίδια συμβολή, ως προς την αφθονία, στη σύσταση της βιοκοινότητας. Σχετικά χαμηλή (0,64) παρουσιάστηκε η τιμή στα 25 cmbsf του Amsterdam MV, όπου (σύμφωνα και με τα δεδομένα του κεφαλαίου 3) κυριάρχησε ένα φυλότυπος. Για τα Archaea οι τιμές του J είναι στις περισσότερες περιπτώσεις μικρότερες. Στα 15 και 20 cmbsf του Kazan MV, αν και οι τιμές της ποικιλότητας ήταν χαμηλές (λόγω του μικρού αριθμού των φυλοτύπων) οι τιμές του J ήταν υψηλές και υποδεικνύουν την συνεπικράτεια των φυλοτύπων που βρέθηκαν. Στους υπόλοιπους ορίζοντες οι τιμές της ισοκατανομής ακολούθησαν αυτές της ποικιλότητας. Ιδιαίτερα χαμηλές ήταν οι τιμές στα 30 cmbsf του Amsterdam MV (0,56) και στα 0 cmbsf του Kazan MV (0,35), όπου φαίνεται ότι ανιχνεύθηκαν λίγοι φυλότυποι και ένας από αυτούς κυριάρχησε.

Η ανάλυση ομαδοποίησης χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την αποκάλυψη (αν υπάρχουν) προτύπων ομοιότητας των βιοκοινοτήτων που μελετήθηκαν. Εφαρμόστηκε, τόσο για τις κοινότητες των Archaea όσο και των Bacteria, σε επίπεδο φυλοτύπου και σε επίπεδο φυλογενετικής ομάδας. Για τα Archaea τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από τις δύο προσεγγίσεις ήταν σε συμφωνία (Σχήμα 4.1 a και b, Σχήμα 4.2 a και b και Σχήμα 4.3 a και b).

Για τις κοινότητες των Bacteria, όταν η ομοιότητα στο επίπεδο του φυλοτύπου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ανάλυση ομαδοποίησης, οι περισσότεροι ορίζοντες

έδειξαν χαμηλή ομοιότητα μεταξύ τους (<0,4) γεγονός που υποδηλώνει ότι καθένας από αυτούς φιλοξενεί μία διακριτή κοινότητα Bacteria και υπάρχουν λίγοι μόνο κοινοί φυλότυποι. Ωστόσο υψηλή ομοιότητα έδειξαν οι οριζόντες ιζήματος 15 και 20 cmbsf στο Amsterdam MV και οριζόντες ιζήματος 15 και 20 cmbsf στο Kazan MV (Σχήμα 4.1c και 4.2c αντίστοιχα), όχι όμως και τα δύο ηφαίστεια μεταξύ τους (Σχήμα 4.3c). Σε αυτά τα βάθη μία υψηλά εξειδικευμένη κοινότητα Bacteria, διαφορετική σε κάθε ένα από τα ηφαίστεια ιλύος φαίνεται να επικρατεί.

Κατά την προσέγγιση όπου χρησιμοποιήθηκαν οι αφθονίες των φυλογενετικών ομάδων για τη σύγκριση των κοινοτήτων των Bacteria, προέκυψαν αρκετές ομάδες ομοιότητας. Ωστόσο, η ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή. Στις περιπτώσεις που οι φυλότυποι (ειδικά όσοι εμφανίζουν αυξημένη παρουσία ή

επικρατούν σε μία βιβλιοθήκη κλώνων) ανήκουν σε μία ευρεία και φυλογενετικά/λειτουργικά ποικίλη ομάδα (όπως π.χ. τα γ -Proteobacteria), η ανάλυση ομαδοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (πχ στο Kazan MV, ομαδοποίηση του επιφανειακού οριζοντα με τα 30 cmbsf).

Η ανάλυση ομαδοποίησης στο επίπεδο της φυλογενετικής ομάδας είναι αρκετά απλούστερη σε σχέση με την ίδια ανάλυση στο επίπεδο του φυλοτύπου και έχει χρησιμοποιηθεί από ερευνητές όταν η ίδια ανάλυση στο επίπεδο του φυλοτύπου φαίνεται να μην οδηγεί σε συμπεράσματα (Heijs *et al.* 2008). Ωστόσο, θα πρέπει να αποφεύγεται η εφαρμογή της ανάλυσης ομαδοποίησης στο επίπεδο της φυλογενετικής ομάδας, ιδιαίτερα όταν περιλαμβάνονται σε αυτές μεταβολικά και λειτουργικά διαφορετικοί οργανισμοί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Μοριακή ποικιλότητα των μεθανιογόνων και μεθανιότροφων μικροοργανισμών με τη χρήση του γονιδίου *mcr*

5.1 ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΟΣΥΝΕΝΖΥΜΟΥ

Μ

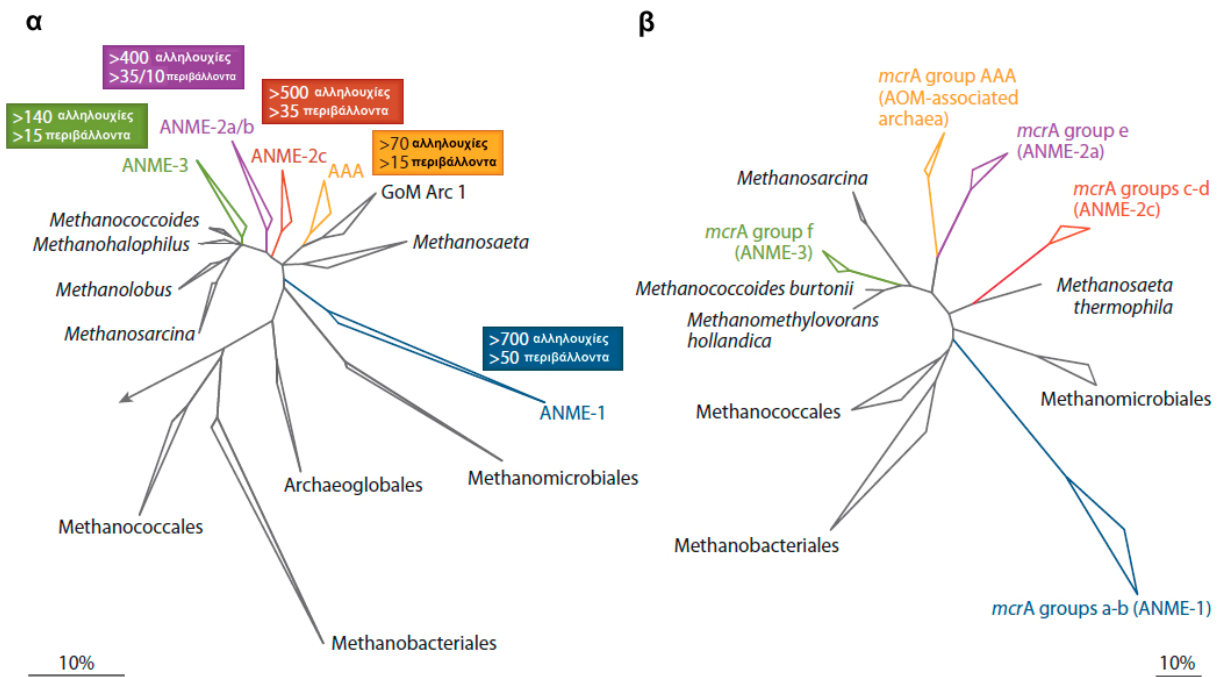
Η αναγωγή του μεθυλοσυνενζύμου M, MCR, καταλύει την αναγωγή του μεθυλοσυνενζύμου M (CH₃-S-CoM) από το συνένζυμο B (HS-CoB), σε μεθάνιο και CoM-S-S-CoB. Η αντίδραση παραγωγής του μεθανίου είναι καθολική για όλους τους μεθανιογόνους οργανισμούς. Η αναγωγή του μεθυλοσυνενζύμου περιέχει ένα άτομο Ni συνδεδεμένο με τον συμπάραγοντα F₄₃₀. Αυτή η πρωτεΐνη πιστευόταν ότι απαντάται αποκλειστικά στα μεθανιογόνα Archaea και για το λόγο αυτό το γονίδιο *mcr* που κωδικοποιεί την αναγωγή του μεθυλο-συνενζύμου M χρησιμοποιήθηκε ως μοριακός δείκτης για τα μεθανιογόνα Archaea (Springer *et al.* 1995, Luton *et al.* 2002, Chin *et al.* 2004, Banning *et al.* 2005). Ωστόσο, το 2003 βρέθηκε ότι η αναγωγή του μεθυλο-συνενζύμου, ο συμπάραγοντας που φέρει το Ni και το *mcr* γονίδιο υπάρχουν επίσης στα μεθανιότροφα Archaea που ανήκουν στις ομάδες ANME-1 και ANME-2 (Hallam *et al.* 2003, Krüger *et al.* 2003, Hallam *et al.* 2004).

Σε αυτά τα ευρήματα στηρίχτηκε η υπόθεση ότι η αναγωγή του μεθυλοσυνενζύμου M μετέχει και στο βιοχημικό μονοπάτι της αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου. Η ισχύς αυτής της υπόθεσης φαίνεται να επιβεβαιώνεται από τη βιοχημική ανάλυση μικροβιακών ταπήτων από τη Μαύρη Θάλασσα που αποτελούνται από Archaea της ομάδας ANME-1 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Αυτοί οι τάπητες περιέχουν, σε υψηλό

ποσοστό, ένα ένζυμο που λόγω της πρωτοταγούς του δομής των υπομονάδων του και του συμπάραγοντα Ni σχετίζεται στενά με την αναγωγή του συνενζύμου M των μεθανιότροφων. Εργαστηριακές αναλύσεις αυτών των ταπήτων έδειξαν ότι δεν μπορούν να επιτελέσουν αποδοτικά μεθανιογένεση άλλα εμπλέκονται στην AOM (Michaelis *et al.* 2002, Krüger *et al.* 2003, Pimenov & Ivanova 2005).

Η αναγωγή του μεθυλο-συνενζύμου M αποτελείται από τρεις υπομονάδες σε διάταξη α₂β₂γ₂ και περιέχει δύο μόρια πορφυρινικού δακτυλίου σαν προσθετική ομάδα, που φέρει Ni, και ονομάζεται συμπάραγοντας F₄₃₀. Τα ένζυμα που απαντώνται σε περιβάλλοντα που διενεργείται AOM έχει την ίδια δομή αλλά σε αυτά τα περιβάλλοντα πάντοτε συνυπάρχει και μορφή της αναγωγής που φέρουν τροποποιήσεις. Η κυριότερη από αυτές είναι ότι ο συμπάραγοντας Ni έχει διαφορετική μορφή και μάζα 951 Da σε σχέση με τα 905 Da του F₄₃₀ των μεθανιογόνων (Shima & Thauer 2005).

Η αναγωγή του μεθυλο-συνενζύμου M κωδικοποιείται από το οπερόνιο *mcrBDCGA* (Reeve *et al.* 1997). Το γονίδιο που κωδικοποιεί των α υπομονάδα, το *mcrA*, περιέχει συντηρητικές περιοχές στην αλληλουχία του, που έχουν σχετιστεί με τις θέσεις κατάλυσης της αναγωγής (Hallam *et al.* 2003). Η φυλογένεση με βάση το *mcrA* ακολουθεί τη φυλογένεση με βάση το 16S rRNA (Springer *et al.* 1995, Luton *et al.* 2002) επιτρέποντας την ταυτοποίηση μεθανιογόνων και μεθανιότροφων Archaea με τη χρήση των



Εικόνα 5.1 Φυλογενετικά δέντρα που δείχνουν τις σχέσεις (α) των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου των ANME σε σχέση με επιλεγμένες αλληλουχίες αναφοράς της επικράτειας των Archaea. Τα δεδομένα στα έγχρωμα κουτιά δίνουν πληροφορίες για την κατανομή και την αφθονία των αλληλουχιών που έχουν βρεθεί. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση που αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών (β) των πρωτεϊνικών αλληλουχιών της α υπομονάδας της αναγωγάσης του μεθυλοσυνενζύμου M σε σχέση με επιλεγμένες αλληλουχίες αναφοράς της επικράτειας των Archaea. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση που αντιστοιχεί σε 10% νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών (τροποποιημένη από Knittel & Boetius 2009)

αλληλουχιών του *mcrA* και των αντίστοιχων πρωτεϊνών (Εικόνα 5.1). Επιπλέον, ενώ η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών μέσω του 16S rRNA παρέχει έμμεσες μόνο πληροφορίες για τη φυσιολογία και τη λειτουργική ποικιλότητα μέσω υποθέσεων λόγω φυλογενετικής συγγένειας, η αποκωδικοποίηση εξειδικευμένων λειτουργικών ενζύμων οδηγεί σε άμεση ανάλυση της πιθανής φυσιολογίας μιας βιοκοινότητας.

Διάφορα ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση των *mcrA* γονιδίων (Ohkuma *et al.* 1995, Springer *et al.* 1995, Hales *et al.* 1996, Luton *et al.* 2002). Οι εκκινητές διαφέρουν στο μήκος τους, τη θέση του γονιδίου που στοχεύουν και το βαθμό εκφύλισής τους. Μελέτες, στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί δύο διαφορετικά ζεύγη

εκκινητών αναφέρουν διαφορές ή περιορισμούς στην κάλυψη των μεθανιογόνων και μεθανιότροφων taxa (Lueders *et al.* 2001, Banning *et al.* 2005, Nercessian *et al.* 2005). Υπάρχουν επίσης εξειδικευμένοι για συγκεκριμένες ομάδες εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ποσοτική PCR (Denman *et al.* 2007, Nunoura *et al.* 2008). Το ζεύγος εκκινητών MCR έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί σε μελέτες εδάφους από καλλιέργειες ρυζιού ή σε μελέτες μεθανιογόνων από το ριζικό σύστημα ρυζιού (Chin *et al.* 1999, Ramakrishnan *et al.* 2001, Conrad *et al.* 2009) αλλά και σε υδροθερμικά ιζήματα (Dhillon *et al.* 2005). Οι ME εκκινητές και οι πιο πρόσφατα κατασκευασμένοι ML έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερο εύρος περιβαλλόντων από wetland και λιμναία ιζήματα (Earl *et al.* 2003, Castro *et*

al. 2004, Banning *et al.* 2005, Smith *et al.* 2007) σε υδροθερμικούς, υπεράλμυρους και βαθείς πυθμένες θαλασσών και περιβάλλοντα μεθανιοϋδριτών (Inagaki *et al.* 2004b, Newberry *et al.* 2004, Nercessian *et al.* 2005, Parkes *et al.* 2005, Smith *et al.* 2008), καθώς και σε πεπτικό σύστημα και κοπρώδη σωματίδια ζώων (Tatsuoka *et al.* 2004, Ufnar *et al.* 2007). Το ζεύγος των ME έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *mcrA* των Archaea που επιτελούν Αναερόβια Οξείδωση Μεθανίου (Hallam *et al.* 2004, Lloyd *et al.* 2006, Lösekann *et al.* 2007).

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ως μήτρα περιβαλλοντικού DNA για την κατασκευή των βιβλιοθηκών κλώνων του *mcrA* γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ποσότητα DNA που είχε εκχυλιστεί για τις ανάγκες δημιουργίας των βιβλιοθηκών κλώνων του 16S RNA γονιδίου, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.

5.2.1 Ενίσχυση *mcrA* γονιδίου, έλεγχος παρουσίας

Τα μόρια εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του *mcrA* γονιδίου είναι οι ME1 5' GCMATGCARATHGGWATGTC 3' και ME2 5' TCATKGCRTAGTTDGGGRAGT 3' (Hales *et al.* 1996).

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 0,5 μl μήτρας DNA, ενώ ο τελικό όγκος αυτής ήταν 20 μl. Τα διαλύματα της αντίδρασης περιείχαν 1x ρυθμιστικού διαλύματος High Yield Reaction Buffer (KapaBiosystems, USA), διάλυμα τριφωσφωρικών δεοξυνουκλεοσιδίων (200μM για κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 pmol/μl από τον κάθε εκκινητή και 0.4U πολυμεράσης KAPATaq DNA (KapaBiosystems, USA). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν, έναν αρχικό κύκλο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για

2min, ακολουθούμενος από ένα αριθμό επαναλαμβανόμενων κύκλων στους 96 °C για 30 sec, στους 50 °C για 40 sec και στους 72 °C για 50 sec. Εφαρμοζόταν και ένα τελικό στάδιο όπου γινόταν επιμήκυνση των αντιγράφων στους 72 °C για 10 min.

Για τον έλεγχο της ύπαρξης του γονιδίου εφαρμόστηκαν αρχικά 30 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, ενώ στα δείγματα που δεν ανιχνεύθηκε προϊόν προστέθηκαν επιπλέον κύκλοι ή/και αυξήθηκε η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για να αποφευχθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Τα προϊόντα της PCR ελέγχονταν για την ορθότητα του μεγέθους τους και την καθαρότητά τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% με μάρτυρα, GeneRuler 100bp DNA ladder plus (Fermentas, Lithuania).

5.2.2 Κλωνοποίηση, φυλογενετική ανάλυση

Η επιλογή των δειγμάτων που ερευνηθήκαν για τη διερεύνηση της λειτουργικής τους ποικιλότητας επιλέχθηκαν με βάση με βάση την κατακόρυφη κατανομή των θειικών και μεθανίου καθώς και την αντίστοιχη κατανομή των λιπιδιακών βιοδεικτών (κεφάλαιο 2). Έτσι, ως αντιπροσωπευτικά της ζώνης μετατροπής θεωρήθηκαν τα δείγματα των 15 και 20 cmbsf ενώ επίσης κλωνοποιήθηκαν οι πιο επιφανειακοί και οι βαθύτεροι ορίζοντες για να μελετηθεί και κατακόρυφη διαφοροποίηση της ποικιλότητας του λειτουργικού γονιδίου *mcrA*.

Για τα δείγματα που επιλέχθηκαν ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο για την PCR που παρουσιάστηκε παραπάνω άλλα με μείωση των κύκλων της αντίδρασης μετά από βελτιστοποίηση αυτής.

Ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων με χρήση του Montage kit (Millipore,

USA) και κλωνοποίηση με τη χρήση του TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, USA) σε ηλεκτροδεκτικά κύτταρα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επιστροφή των μετασηματισμένων Bacteria έγινε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Luria Bertani. Έγινε επώαση για 16-18 ώρες στους 37°C.

Η επιλογή των κλώνων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με το επιθυμητό προϊόν (ένθεμα) έγινε με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση των ειδικών για το πλασμίδιο εκκινητών M13f (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') και M13r (5' CAGGAAACAGCTAGAC 3') και έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%. Οι κλώνοι αυτοί στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Luria Bertani¹⁶ με καναμυκίνη για 16-18 ώρες στους 37°C σε ανακινούμενο επωαστήρα. Ακολούθησε η απομόνωση των πλασμιδίων με το kit NucleoSpin Plasmid Purification (Macherey Nagel, Germany). Τα απομονωμένα πλασμίδια στάλθηκαν για προσδιορισμό αλληλούχισης του ενθέματος (Macrogen, Korea). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ελέγχθηκαν για λάθη (μεγάλος αριθμός αμφίβολων βάσεων, ύπαρξη χημικών αλληλουχιών). Όσες παρουσίασαν λάθη απορρίφθηκαν ενώ οι υπόλοιπες μεταφράστηκαν στις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες τοποθετήθηκαν σε ένα αρχείο υπό μορφή FASTA για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Συγκρίνεται η επί τοις εκατό ομοιότητα των πρωτεϊνικών αλληλουχιών και ακολουθεί η κατάταξή τους σε ομάδες ομοιότητας με βάση το πρόγραμμα Clustalw (Thompson *et al.* 1994) και τη δικτυακή εκδοχή αυτού, στην ιστοσελίδα

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες, που αντιστοιχούν στο γονίδιο *mcrA* και δείχνουν ομοιότητα μεγαλύτερη ή ίση με το 98% θεωρούνται ότι ανήκουν στον ίδιο φυλότυπο.

Ακολούθησε σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών με τη χρήση του διαδικτυακού προγράμματος Basic Local Alignment Tool [BLAST] (Altschul *et al.* 1990), που ταυτοποιεί τις αλληλουχίες με άλλες που είναι ήδη κατατεθειμένες σε διεθνείς τράπεζες δεδομένων και παρουσιάζει τους κοντινότεροι συγγενείς. Ακολούθησε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με τους ήδη γνωστούς συγγενείς και κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων με το πρόγραμμα MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007), τη μέθοδο αποστάσεων Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987) και τη χρήση του μοντέλου JTT (Jones *et al.* 1992). Οι κόμβοι του δέντρου και η στατιστική εγκυρότητα του δέντρου ελέγχθηκαν με τη μέθοδο bootstrap (Felsenstein 1985) για 1000 επαναλήψεις.

Για τον έλεγχο της πληρότητας των βιβλιοθηκών χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης κάλυψης Good's C, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρουσία του γονιδίου *mcrA* ανιχνεύθηκε σε όλα τους ορίζοντες ιζήματος από το AmsterdamMV και σε όλους εκτός από τον επιφανειακό ορίζοντα για το Kazan MV. Οι κωδικές ονομασίες των κλώνων για τις βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν επιλέχθηκαν ώστε να υποδεικνύουν τη βιβλιοθήκη κλώνων από την οποία προήλθαν. Οι κωδικοί ξεκινάνε με πέντε γράμματα που αντιπροσωπεύουν το υποθαλάσσιο ηφαίστειο από το οποίο έγινε η δειγματοληψία και είναι **AMSMV** και **KZNMV** για το Amsterdam MV και το Kazan MV, αντίστοιχα. Ακολουθεί αριθμός

¹⁶ 1.0% Τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1.0% NaCl, pH 7.0 και 15g l⁻¹ άγαρ

ενδεικτικός του βάθους του ιζήματος το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή της βιβλιοθήκης **0, 15, 20, 30** cmbsf. Οι χαρακτήρες **mcr** υποδηλώνουν ότι πρόκειται για βιβλιοθήκη κλώνων του *mcrA* γονιδίου.

Τα δεδομένα για τη ζώνη ιζήματος στα 15 και 20 cmbsf δεν αποτελούν πειραματικό αποτέλεσμα αυτής της παρούσας εργασίας και για το λόγο αυτό δε θα παρουσιαστούν αναλυτικά στα αποτελέσματα. Αντλήθηκαν από τη δημοσίευση των Kogmas *et al.* (2008) και χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου για τη συγκριτική μελέτη της σύστασης των βιοκοινοτήτων των Archaea με βάση το γονίδιο *mcrA*. Για αυτούς τους κλώνους διατηρήθηκαν οι κωδικές ονομασίες που υπήρχαν στο δημοσιευμένο άρθρο.

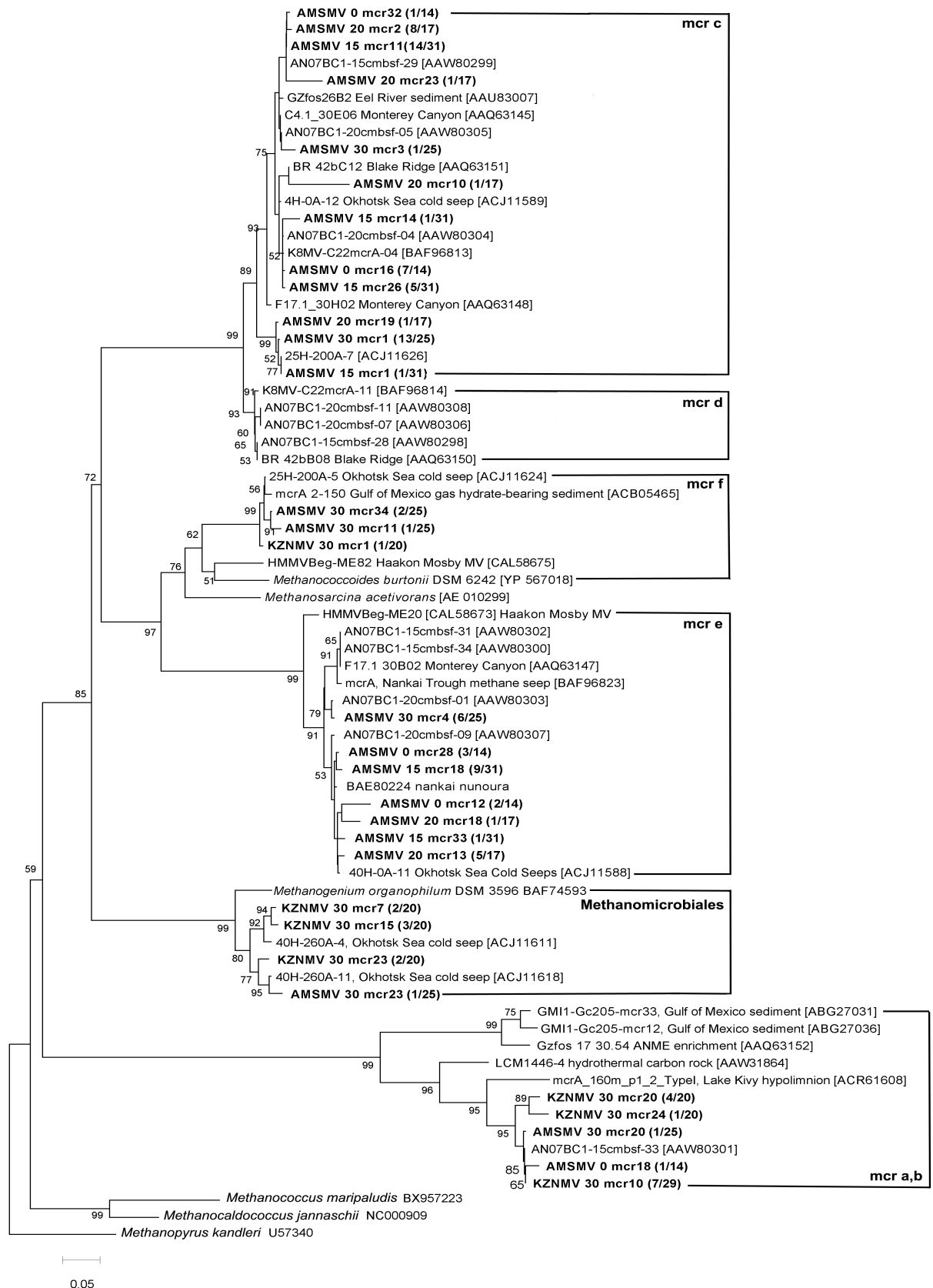
Η ονοματολογία που χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή των φυλογενετικών ομάδων που σχηματίζονται με τη χρήση του *mcrA* ως φυλογενετικού δείκτη ακολουθεί την ονοματολογία που εισήγαγαν οι Hallam *et al.* (2003), όπου χαρακτηρίζονται πέντε ομάδες φυλοτύπων με βάση το γονίδιο *mcrA*: *mcr a*, *mcr b*, *mcr c*, *mcr d* και *mcr e*, ενώ, αργότερα, χαρακτηρίστηκε από τους Lösekann *et al.* (2007) μία ακόμα ομάδα, η *mcr f*.

Συνολικά αλληλουχήθηκαν 107 κλώνοι οι οποίοι αντιστοιχήθηκαν σε 31 φυλότυπος. Το φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων για όλους τους ορίζοντες που εξετάστηκαν παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1. Ο δείκτης κάλυψης των βιβλιοθηκών που κατασκευάστηκαν ήταν >0,8 (Σχήμα 5.2) γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουμε ικανοποιητική αντιπροσώπευση των Archaea μεθανιογόνων και μεθανιότροφων κοινοτήτων στις βιβλιοθήκες αυτές.

Στη βιβλιοθήκη κλώνων του *mcrA* για τον επιφανειακό ορίζοντα του Amsterdam MV κυριάρχησαν φυλότυποι που ανήκουν στην ομάδα *mcr group c* (AMSMV-0-*mcr16* και AMSMV-0-*mcr32*, 57,1%), ακολούθησαν φυλότυποι της ομάδας *mcr group e* (AMSMV-0-*mcr12* και AMSMV-0-*mcr28*, 35,7%). Τέλος, ένας φυλότυπος (AMSMV-0-*mcr18*, 7,1%) φαίνεται ότι συσχετίζεται με την ομάδα *mcr group a,b*.

Στον ορίζοντα των 15 cmbsf βρέθηκαν 2 ομάδες, οι *mcr c* (AMSMV-15-*mcr11*, AMSMV-15-*mcr26*, AMSMV-15-*mcr1*, AMSMV-15-*mcr14*, 67,7%) και *mcr e* (AMSMV-15-*mcr18*, AMSMV-15-*mcr33*, 32,3%).

Αυτές οι δύο ομάδες και με παρόμοια σχετική αντιπροσώπευση απαντήθηκαν και στον ορίζοντα των 20 cmbsf. Στην ομάδα *mcr c* ανήκουν οι φυλότυποι AMSMV-20-*mcr2*, AMSMV-20-*mcr10*, AMSMV-20-*mcr19*, AMSMV-20-*mcr23* (64,7%) ενώ οι AMSMV-20-*mcr13*, AMSMV-20-*mcr18* (35,3%) σχετίστηκαν με την ομάδα *mcr c*. Ο ορίζοντας των 30 cmbsf για το Amsterdam MV παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποικιλότητα σε σχέση με τους υπόλοιπους ορίζοντες του ίδιου ηφαιστείου που μελετήθηκαν με αυτή την προσέγγιση. Επικράτησαν φυλότυποι της ομάδας *mcr c* (AMSMV-30-*mcr1*, AMSMV-30-*mcr1*, 56,0%). Ο φυλότυπος AMSMV-30-*mcr4*, που ανήκει στην ομάδα *mcr e* βρέθηκε σε ποσοστό 24,0%, ενώ ο AMSMV-30-*mcr20* σχετίζεται με την ομάδα των *mcr a, b*. Φυλότυποι (AMSMV-30-*mcr34*, AMSMV-30-*mcr11*) που σχετίζονται πιθανά με την ομάδα των *mcr f* βρέθηκαν σε ποσοστό 12,0%. Τέλος ένας φυλότυπος, ο AMSMV-30-*mcr23* ομαδοποιήθηκε μέσα στα Methanomicrobiales.



Σχήμα 5.1 Φυλογενετικό δέντρο των *mcrA* φυλοτύπων των Archaea από ίζημα ιλύος του Amsterdam MV και Kazan MV, βασισμένο στις αντίστοιχες πρωτεϊνικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο απόστασης Neighbour-Joining με την ανάλυση JTT. Οι κωδικοί των φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν (έντονα γράμματα) σηματοδοτούν το βάθος προέλευσης του δείγματος. Οι αριθμοί των πανομοιότυπων αλληλουχιών ($\geq 98\%$ ομοιότητα) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αλληλουχιών της κάθε βιβλιοθήκης παρουσιάζονται στις παρενθέσεις. Χίλιες επαναλήψεις bootstrap έλαβαν χώρα και τα ποσοστά μεγαλύτερα του 50% εμφανίζονται στους κόμβους των κλάδων. Οι αριθμοί στις αγκύλες είναι οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση δεδομένων GenBank. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 5% εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση.

Για το Kazan MV, κατασκευάστηκε μία μόνο βιβλιοθήκη για το γονίδιο *mcrA*, από το βαθύτερο ορίζοντα των 30 cmbsf. Η πλειοψηφία των φυλοτύπων σε αυτή (KZNMV-30-*mcr10*, KZNMV-30-*mcr20*, KZNMV-30-*mcr10*, 60,0%) σχετίζεται φυλογενετικά με την ομάδα των *mcr a,b*, οι φυλότυποι KZNMV-30-*mcr23*, KZNMV-30-*mcr7* και KZNMV-30-*mcr15* (35,0%) ανήκουν στα Methanomicrobiales ενώ ο KZNMV-30-*mcr1* (5,0%) σχετίζεται πιθανά με την ομάδα των *mcr f*.

5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάλυση του *mcrA* αποκάλυψε την ύπαρξη και μεθανιογόνων οργανισμών της τάξης των Methanomicrobiales στους βαθύτερους ορίζοντες των ιζημάτων που μελετήθηκαν και για τα δύο ηφαίστεια ιλύος Amsterdam και Kazan MV. Περισσότεροι σε αριθμό αλλά και με μεγαλύτερες τιμές σχετικής αφθονίας βρέθηκαν οι φυλότυποι του Kazan MV. Οι φυλότυποι που ομαδοποιήθηκαν στην ομάδα *mcr e* μπορεί να ανήκουν είτε στα ANME-2 ή -3, είτε σε μεθανιογόνα Methanosarcinales.

Οι φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν με βάση τη φυλογένεση του *mcr* γονιδίου ανήκουν στις ομάδες *mcr c*, *e* και *f* των Methanosarcinales, στο φύλο των Methanomicrobiales και στην ομάδα των *mcr a,b*. Ενώ, δεν ανιχνεύθηκαν γονίδια *mcrA* που ανήκουν στους υπόλοιπους αντιπροσώπους των Archaea που μπορεί να φέρουν το γονίδιο και συγκεκριμένα στις τάξεις των Methanobacteriales, Methanococcales και Methanopyrales.

Η ομάδα *mcr a,b* έχει αντιστοιχηθεί με την ομάδα των ANME-1, η ομάδα *mcr c* με τα ANME-2c και η ομάδα *mcr f* με τα ANME-3. Στα ANME-2a,b έχουν αποδοθεί από τους ερευνητές δύο διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες με βάση το γονίδιο *mcrA*. Οι Hallam *et al.* (2003), οι πρώτοι που κωδικοποίησαν τις

ομάδες που προέκυψαν από την ανάλυση του *mcrA* γονιδίου, αντιστοιχισαν τα Archaea ANME-2a,b με την ομάδα των *mcr d* ενώ η ομάδα των *mcr e* τοποθετήθηκε στα Methanosarcinales αλλά χωρίς να σχετιστεί με κάποια από τις γνωστές ομάδες αυτών. Την ίδια αντιστοίχιση υποστήριξαν και οι Lloyd *et al.* (2006), Numoura *et al.* (2006) και Teske & Sørensen (2008) ενώ άλλοι ερευνητές (Alain *et al.* 2006, Lösekann *et al.* 2007, Kormas *et al.* 2008, Ye *et al.* 2009) απέδωσαν την ομάδα *mcr e* στα ANME-2a.

Η φυλογενετική ανάλυση του Amsterdam MV με βάση τις βιβλιοθήκες κλώνων του *mcrA* γονιδίου έδειξε ότι και στις τέσσερις βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν (0, 15, 20 και 30 cmbsf) επικράτησαν φυλότυποι που ανήκουν στην ομάδα των *mcr c* και αποδίδονται στα ANME-2. Φυλότυποι που ανήκουν στα ANME-2 είχαν βρεθεί σε υψηλά ποσοστά και στις αντίστοιχες αναλύσεις με τη χρήση του 16S rRNA γονιδίου, ενώ αντίστοιχα και η ανάλυση των λιπιδιακών βιοδεικτών υποδεικνύει την επικράτηση αυτής της ομάδας των Archaea.

Στις βιβλιοθήκες κλώνων των 15 και 20 cmbsf, ωστόσο, δε βρέθηκαν αλληλουχίες που σχετίζονται φυλογενετικά με την ομάδα *mcr a,b*, και κατ'επέκταση με την ANME-1, αν και η ομάδα αυτή είχε υψηλή σχετική αφθονία στις αντίστοιχες βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA. Ομοίως, στον ορίζοντα ιζήματος των 30 cmbsf ένα μικρό ποσοστό των κλώνων που αναλύθηκαν σχετίστηκαν με την ομάδα *mcr f*, η οποία πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει τα ANME-3 Archaea, ενώ αυτά φάνηκαν να κυριαρχούν στη βιβλιοθήκη κλώνων του 16S rRNA γονιδίου (κεφάλαιο 3).

Αντίστοιχα, στη βιβλιοθήκη κλώνων του *mcrA* από τα 30 cmbsf για το Kazan MV δεν βρέθηκαν φυλότυποι που θα μπορούσαν να αντιστοιχηθούν στις ομάδες των ANME-2, αν και φυλότυποι που ανήκουν στα ANME-2 είχαν

βρεθεί στη αντίστοιχη βιβλιοθήκη κλώνων του 16S rRNA.

Τα αποτελέσματα των δυο προσεγγίσεων σε παρόμοιες έρευνες, αν και διαφοροποιούνται ως προς τη σχετική αντιπροσώπευση των ομάδων συνήθως βρίσκονται σε συμφωνία. Σε αρκετές περιπτώσεις όμως έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη ή μικρότερη ποικιλότητα φυλοτύπων που ανιχνεύονται στις βιβλιοθήκες κλώνων του *mcrA* σε σχέση με τις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου των Archaea (Dhillon *et al.* 2005, Kelley *et al.* 2005, Alain *et al.* 2006, Inagaki *et al.* 2006a, Nunoura *et al.* 2006, Lösekann *et al.* 2007, Kormas *et al.* 2008, Ye *et al.* 2009) με αποτέλεσμα ορισμένες ομάδες να μην ήταν δυνατόν να ανιχνευθούν με μία από τις δύο αναλύσεις. Για τα ANME-1 συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η αδυναμία ανίχνευσης των αντίστοιχων *mcr* ομάδων και σε προηγούμενες έρευνες (Lösekann *et al.* 2007, Reed *et al.* 2009).

Ο φαινομενικά μικρός αριθμός των κλώνων που αναλύθηκαν δε θα πρέπει να έχει δημιουργήσει αυτή την ανακολουθία, καθώς όπως φαίνεται από το δείκτη κάλυψης (Σχήμα 5.2), αυτός έχει φτάσει σε πλάτωμα, γεγονός που υποδηλώνει την επαρκή αντιπροσώπευση στη βιβλιοθήκη όλων των φυλοτύπων.

Εφόσον τα Archaea των ομάδων ANME δεν έχουν απομονωθεί προς το παρόν, δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση του κάθε φυλοτύπου με βάση το 16S rRNA με αντίστοιχο φυλότυπο με βάση το *mcrA* γονίδιο. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση των μεθανιότροφων Archaea (Meyerdierks *et al.* 2005) δεν έδωσε απάντηση στα ζητήματα που έχουν προκύψει από τις δυο προσεγγίσεις. Το 16S rRNA γονίδιο του φοσμιδίου fos0128g3-03e1 αυτής της μεταγονιδιωματικής έρευνας παρουσίασε υψηλή ομοιότητα (>99%) και

αποτελεί ουσιαστικά τον ίδιο φυλότυπο με τους κλώνους AMSMV-15-A8 και AMSMV-20-A12 (βλέπε κεφάλαιο 3) που εμφάνισαν την υψηλότερη σχετική αφθονία ανάμεσα στα ANME-1 και θα περιμέναμε να αντιπροσωπεύονται και στη βιβλιοθήκη κλώνων του *mcrA* γονιδίου στο Amsterdam MV. Ωστόσο, ούτε σε αυτό το φοσμίδιο (μέγεθος 66432 b) ούτε στο συνολικό κομμάτι του ANME-1 που ανακατασκευάστηκε (μέγεθος 155242 b) δεν εντοπίστηκε η γενετική περιοχή που κωδικοποιεί για την υπομονάδα α της αναγωγάσης του μεθυλοσυνενζύμου M. Δεν υπάρχει επομένως κάποια ένδειξη για την ακριβή νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου αυτού και για το αν τα μόρια εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τη δυνατότητα τελικά να πολλαπλασιάσουν μέσω της PCR αυτή την περιοχή ή παρουσιάζεται αναντιστοιχία των αλληλουχιών και είναι πρέπει να σχεδιαστούν νέοι εκκινητές.

Φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στο *mcrA* γονίδιο δεν έχει γίνει σε άλλες έρευνες από ιζήματα ιλύος της Ανατολικής Μεσογείου, πέρα από την εργασία των Kormas *et al.* (2008) για το Kazan MV που λειτουργεί συμπληρωματικά στη μελέτη που παρατίθεται εδώ. Δεν υπάρχουν επομένως κωδικές αλληλουχίες του γονιδίου που θα μπορούσαν συγκριτικά να δώσουν μία εξήγηση στην ασυμφωνία των προσεγγίσεων που παρατηρήθηκε. Όμως, έχουν βρεθεί (Heijs *et al.* 2008) αλληλουχίες κλώνων του 16S rRNA γονιδίου σε ορίζοντα ιζήματος 14-31 cmbsf του Amsterdam MV που ανήκουν στα ANME-1.

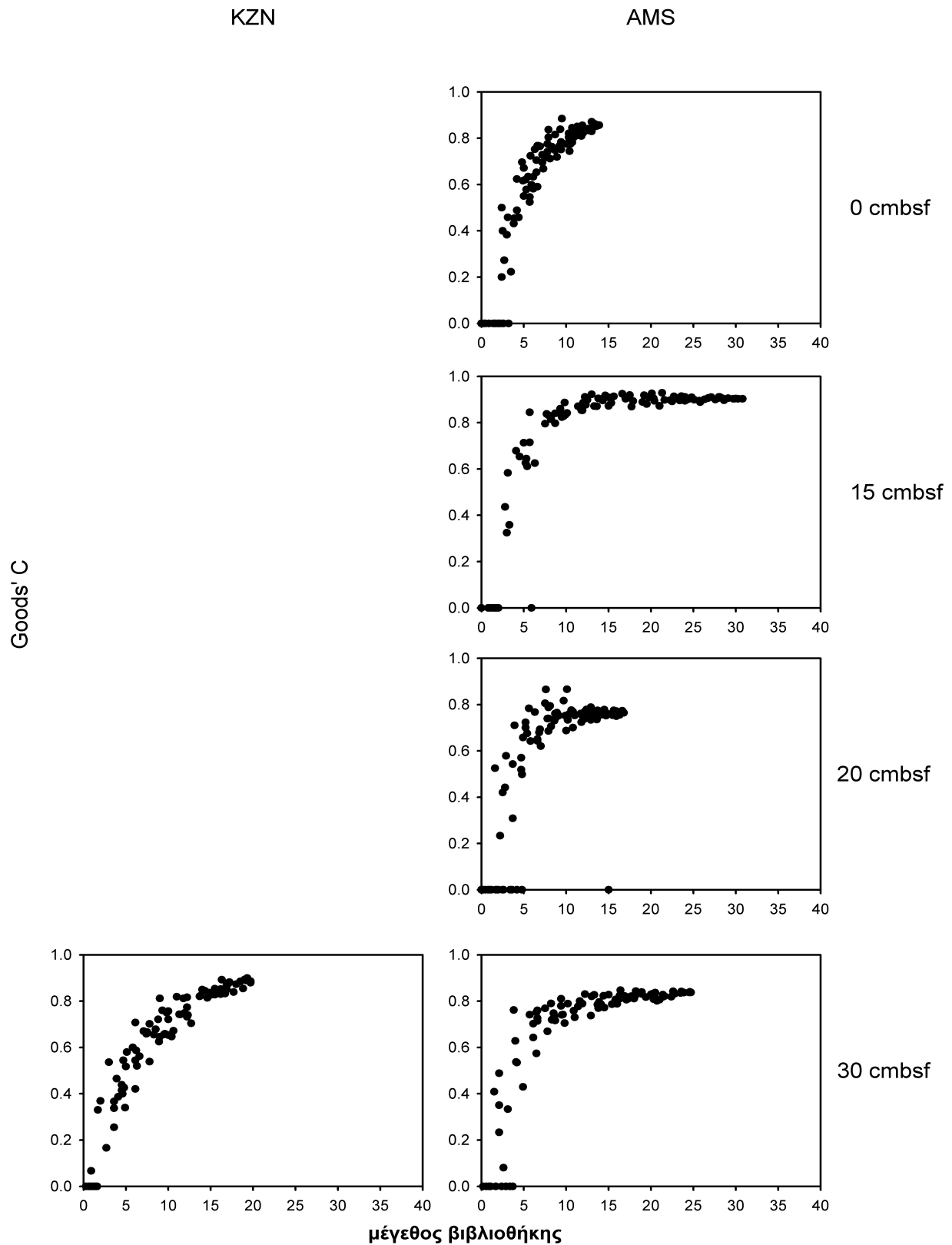
Archaea της ομάδας ANME-1 έχουν ανιχνευθεί σε ιζήμα ιλύος του Amsterdam MV σε όλο το μήκος του πυρήνα εκτός του επιφανειακού ιζήματος και με τη μέθοδο του επιτόπιου φθορίζοντα υβριδισμού [Flourescence *in situ* Hybridization, FISH]

(Kallionaki & Kormas, unpublished data), αν και σε μικρότερο αριθμό σε σχέση με τα ANME-2, υποδεικνύοντας ότι λόγω κάποιου μεθοδολογικού προβλήματος, με πιθανότερη την αδυναμία πρόσδεσης των μορίων εκκινητών, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση αυτής της ομάδας στη βιβλιοθήκη κλώνων του *mcrA* γονιδίου. Ενδείξεις για τη συμβολή των ANME-1 στις βιοκοινότητες των Archaea στο Amsterdam MV βρέθηκαν και με την ανάλυση των λιπιδιακών βιοδεικτών (κεφάλαιο 2).

Όπως, επίσης, φαίνεται και από το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε, οι φυλότυποι που φαίνεται να ανήκουν στη λειτουργική ομάδα των *mcr a,b* από τα ηφαίστεια Ιλύος Amsterdam και Kazan δημιουργούν μονοφυλετικό κλαδί. Ο κοντινότερος φυλότυπος σε αυτή την ομάδα φαίνεται να προέρχεται από υπολίμνιο ενώ οι γνωστοί, από προηγούμενες μελέτες φυλότυποι από ιζήματα μεθανιοϋδριτών και παρόμοια περιβάλλοντα τοποθετούνται σε ξεχωριστό φυλογενετικό κλάδι. Επομένως, είναι πιθανό, να πρόκειται για Archaea των ANME-1 που φέρουν λίγο διαφοροποιημένη αλληλουχία του

mcrA γονιδίου έχοντας ως πιθανό αποτέλεσμα τη λιγότερο αποτελεσματική πρόσδεση των μορίων εκκινητών και τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων φυλοτύπων. Ίσως, όταν υπάρχει τόσο σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων με την ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου και του *mcrA* να πρέπει να επαναλαμβάνεται η ανάλυση με τη χρήση συνδυασμού διαφορετικών εκκινητών που χρησιμοποιούνται για όλα τα Archaea που φέρουν το γονίδιο *mcr* και εκκινητών που επιλεκτικά ενισχύουν μόνο συγκεκριμένες ομάδες Archaea (Lloyd *et al.* 2006).

Αν και η κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του *mcrA* είναι ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη της λειτουργικής ποικιλότητας των Archaea που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του μεθανίου, πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή στην μελέτη των μεθανιότροφων Archaea γιατί οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει και οι εκκινητές που έχουν αναπτυχθεί αφορούν καλά χαρακτηρισμένα στελέχη μεθανιογόνων ή συστήματα, κυρίως χερσαία, όπου επικρατούν μεθανιογόνοι οργανισμοί.



Σχήμα 5.2 Η κάλυψη των βιβλιοθηκών κλώνων του *mcrA* (βασισμένο στον εκτιμητή κάλυψης Good's C) για τον οριζόντια ιζήματος 30 cmbsf του ηφαιστειού υλύος Kazan (KZN) και των οριζόντων ιζήματος 0, 15, 20 και 30 cmbsf του Amsterdam (AMS)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΝΘΕΣΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην Αναερόβια Οξείδωση του Μεθανίου (AOM) και μεθανιογένεση στα ιζήματα μεθανιοϋδριτών δύο υποθαλάσσιων ηφαιστειών ιλύος της Ανατολικής Μεσογείου. Η AOM είναι η σημαντικότερη βιογεωχημική διεργασία που διενεργείται στα περιβάλλοντα ψυχρών αναβλύσεων του θαλάσσιου πυθμένα και η κυριότερη οδός ρύθμισης της ροής του μεθανίου στα θαλάσσια ιζήματα και κατά συνέπεια στη στήλη του νερού και την ατμόσφαιρα.

Όλες οι ενδείξεις από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν υποδηλώνουν ότι τα ιζήματα ιλύος και των δύο υποθαλάσσιων ηφαιστειών (MV), Amsterdam και Kazan, που μελετήθηκαν, φιλοξενούν μικροοργανισμικές κοινότητες αντίστοιχων ενδιαιτημάτων όπου διενεργείται AOM. Οι υψηλές τιμές των λιπιδιακών βιοδεικτών των Archaea που εμπλέκονται στην AOM, υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας εξειδικευμένης βιοκοινότητας Archaea στα ιζήματα αυτά. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από τους φυλοτύπους που προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων του *mcrA* γονιδίου και του 16S rRNA γονιδίου των Archaea και σχετίζονται αποκλειστικά με Archaea που μετέχουν στο μεταβολισμό του μεθανίου, ενώ και οι χαμηλές τιμές βιοποικιλότητας για τα Archaea συνηγορούν υπέρ της άποψης αυτής. Επίσης, *in situ* ανίχνευση ANME Archaea στα ιζήματα ιλύος των ηφαιστειών Amsterdam και Kazan (Kallionaki & Kormas, personal communication) αποδεικνύει την ύπαρξη ενεργούς

βιοκοινότητας Archaea που πραγματοποιεί AOM.

Οι κοινότητες των Archaea μεταξύ των διαφορετικών οριζόντων που εξετάστηκαν έχουν κάποιους κοινούς φυλοτύπους, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου, στην πλειοψηφία τους όμως είναι διαφορετικοί. Από τη σύγκριση των σχετικών τιμών αφθονίας των κυριότερων ομάδων και την ανάλυση ομαδοποίησης προέκυψε ότι υπάρχουν ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών οριζόντων και ο βαθμός ομοιότητας φαίνεται να είναι μεγαλύτερος για τους ορίζοντες του ίδιου ηφαιστείου σε σχέση με το βαθμό ομοιότητας ανάμεσα στα δύο ηφαιστεια. Το μεθάνιο είναι πιθανότατα ο πρωταρχικός παράγοντας που διαμορφώνει τις βιοκοινότητες των Archaea αλλά και άλλοι παράγοντες οδηγούν τελικά στην επικράτηση συγκεκριμένων φυλοτύπων. Παρόμοια οικοφυσιολογική λειτουργία μπορεί να επιτελεστεί σε ένα τέτοιο οικοσύστημα από διαφορετικές ομάδες – φυλοτύπους μικροοργανισμών αλλά ποικίλοι αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες φαίνεται να επιλέγουν αυτούς που θα κυριαρχήσουν.

Η δυνατότητα αξιοποίησης των πηγών ενέργειας σε κάθε ορίζοντα, δεδομένου των υπόλοιπων περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν σε αυτές καθορίζουν και τη βιομάζα – αριθμό κυττάρων που μπορεί να υποστηριχτεί. Αν και στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας δε μετρήθηκε αριθμός κυττάρων στα δείγματα που αναλύθηκαν, εκτιμήσεις μπορούν να γίνουν από τις συγκεντρώσεις των λιπιδιακών βιοδεικτών που μετρήθηκαν. Σύμφωνα επομένως με τις τιμές

των χαρακτηριστικών βιοδεικτών για τα Archaea που μετρήθηκαν φαίνεται στο Amsterdam MV πιθανόν να υπάρχει πολλαπλάσια βιομάζα Archaea σε σχέση με αυτή στο Kazan MV.

Παρουσιάστηκε, επίσης, και διαφορετικό πρότυπο κατανομής των βιοδεικτών αυτών ανάμεσα στα δύο ηφαίστεια. Στο Amsterdam MV η μέγιστη τιμή τους παρουσιάστηκε στο ορίζοντα 15-20 cmbsf, κάτι που είναι σε συμφωνία με τη ζώνη μετάβασης μεθανίου – θειικών, έτσι όπως προέκυψε από τις μετρήσεις αυτών. Φαίνεται ότι οι θέσεις ενεργότητας της AOM βρίσκονται εκεί που συνυπάρχουν και τα δύο υποστρώματα, ενώ όταν είτε το μεθάνιο είτε τα θειικά εξαντλούνται άλλες διεργασίες επικρατούν (Treude *et al.* 2003, Niemann 2005). Στο Kazan MV οι δύο ορίζοντες που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες τιμές βιοδεικτών για τα Archaea παρουσιάζονται μετατοπισμένοι σε σχέση με τη ζώνη μετάβασης, παρατήρηση όμως που είχε προκύψει και από προηγούμενες έρευνες στο ίδιο ηφαίστειο (Haese *et al.* 2003, Werne *et al.* 2004).

Οι κοινότητες των Bacteria παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο κατανομής σε σχέση με αυτές των Archaea, σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από την κατανομή των λιπιδιακών βιοδεικτών, τις σχετικές αφθονίες των κυριότερων ομάδων, τους δείκτες της ποικιλότητας και την ανάλυση ομαδοποίησης. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών βιοδεικτών για τα Bacteria έδειξε ότι στον επιφανειακό ορίζοντα και των δύο ηφαιστειών ιλύος που μελετήθηκαν επικρατούν θειοξειδωτικά Bacteria, αριθμητικά πιθανόν περισσότερα στο Kazan MV. Η ύπαρξη των αντίστοιχων φυλοτύπων επιβεβαιώθηκε και στις βιβλιοθήκες κλώνων από αυτούς τους ορίζοντες.

Η θειοξειδωτική κοινότητα, η παρουσία της οποίας στηρίζεται στο θείο και τα θειούχα ιόντα (προϊόντα της AOM) φαίνεται να έχει σημαντική αντιπροσώπευση στα πρώτα 15 cm του ιζήματος και στα δύο ηφαίστεια ιλύος που μελετήθηκαν. Είναι πιθανόν κάποιο ποσοστό, που δεν μπορεί να προσδιοριστεί, των θειοξειδωτικών Bacteria να ζει ως συμβιώτης στα βενθικά ασπόνδυλα που υπάρχουν στα ιζήματα αυτά.

Για τα θειοαναγωγικά Bacteria διαφορετικοί βιοδείκτες αντανακλούν τη διαφορετική κατακόρυφη κατανομή και αντίστοιχων ομάδων τους στο ιζημα. Ο βιοδείκτης που θεωρείται χαρακτηριστικός Bacteria συντρόφων στη διενέργεια AOM (Elvert *et al.* 2005, Niemann & Elvert 2008), το λιπαρό οξύ cyC17:0ω5,6, παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές του, στους ορίζοντες 15-25 cmbsf για το Amsterdam MV, βάθος που αντιστοιχεί με το μέγιστο της αρχαιόλης – υδροξυαρχαιόλης. Στον ορίζοντα των 25 cmbsf η παρουσία δ-Proteobacteria που ανάγουν θειικά σε συντροφία AOM κυριαρχεί και στη βιβλιοθήκη κλώνων. Η υψηλότερη συγκέντρωση στο Kazan MV μετρήθηκε στον ορίζοντα των 10-15 cmbsf, ενώ η εξειδικευμένη βιοκοινότητα μικροοργανισμών που παρουσιάστηκε στις βιβλιοθήκες κλώνων των 15 και 20 cmbsf (Kormas *et al.* 2008), στους δείκτες βιοποικιλότητας και στην ανάλυση ομαδοποίησης δε φαίνεται να παρουσιάζει το αντίστοιχο λιπιδιακό αποτύπωμα.

Οι φαινομενικές ασυνέπειες των αποτελεσμάτων μεταξύ γεωχημικών, λιπιδιακών και φυλογενετικών αναλύσεων στο Kazan MV υποδεικνύουν πιθανά ότι το «ιστορικό κέντρο» της AOM σε αυτό το σημείο ή γενικά σε όλο το ηφαίστειο μπορεί έχει μεταναστεύσει κατακόρυφα μέσα στο ιζημα, πιθανώς λόγω αλλαγών στη ροή του μεθανίου. Φαίνεται ότι το

λιπιδιακό προφίλ δίνει μια μέση εικόνα των διεργασιών του ιζήματος, ενώ η γεωχημεία του νερού των πόρων αντανακλά τις συνθήκες τη στιγμή της δειγματοληψίας. Τέλος, αν λάβουμε υπόψη μας τους εξαιρετικά αργούς ρυθμούς αύξησης των μικροοργανισμών αυτών και την ανθεκτικότητά τους για παρατεταμένες περιόδους μη ευνοϊκών συνθηκών (Valentine 2007), ακόμα και η ανίχνευσή τους στο πεδίο δεν μπορεί να δώσει ασφαλή συμπεράσματα για την ενεργότητα των διεργασιών τη στιγμή της δειγματοληψία και σε βάθος χρόνου.

Οι διαφορετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βιολογική περιγραφή και μελέτη της ποικιλότητας του οικοσυστήματος που εξετάστηκε προσφέρουν συμπληρωματικές πληροφορίες για αυτό. Οι λιπιδιακοί βιοδείκτες των Archaea και των Bacteria έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για την κατανομή της σχετικής αφθονίας σε επίπεδο βιομάζας των μικροοργανισμών και της ενεργότητας των αντίστοιχων διεργασιών που παράγουν βιοδείκτες και βιομάζα. Ωστόσο, λεπτομερέστερη εικόνα για την ταυτότητα και την ποικιλότητα των μικροοργανισμών αυτών παρουσιάζεται από τη φυλογενετική ανάλυση των ιζημάτων. Επίσης, μέσω των φυλογενετικών αναλύσεων αποκαλύπτονται και ομάδες μικροοργανισμών, όπως είναι τα υποψήφια φύλα των JS1, OP8 και OD1/OP11 Bacteria που δεν καλλιεργηθεί ακόμα και δεν έχουν αντιστοιχηθεί προς το παρόν με κάποιο χαρακτηριστικό λιπιδιακό βιοδείκτη. Καθώς και ομάδες, που λόγω της μικρής τους αντιπροσώπευσης, δεν μπορούν να ανιχνευθούν μέσω των βιοδεικτών τους.

Χρήσιμα συμπεράσματα μπορούν να αντληθούν από τη συγκριτική μελέτη οικοσυστημάτων όπως είναι τα ηφαίστεια ιλύος του Αναξιμανδρου. Τα δύο υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος, Amsterdam και Kazan, αν και

βρίσκονται στην ίδια γεωγραφική περιοχή, φαίνεται να διαφοροποιούνται σε επίπεδο βιοκοινοτήτων. Τα διαθέσιμα γεωλογικά και γεωχημικά δεδομένα μπορούν ίσως να εξηγήσουν κάποιους από τους λόγους που διαμόρφωσαν διαφορετικές βιοκοινότητες μικροοργανισμών.

Οι γεωλογικές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι και τα ηφαίστεια Amsterdam και Kazan είναι τα πιο ενεργά υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος της Ανατολικής Μεσογείου, τουλάχιστον μεταξύ αυτών που υπάρχουν στο πεδίο Όρων του Αναξιμανδρου και Olymri (Olu-Le Roy *et al.* 2004, Zitter 2006). Τα δύο ηφαίστεια διαφέρουν στο μέγεθος αλλά και την ιζηματολογία, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την κατανομή και ροή του μεθανίου και πιθανά τις βιοκοινότητες που εξαρτώνται από το μεθάνιο (Niemann 2005). Η γεωλογική δομή του μεγαλύτερου από τα δύο - αλλά και τα υπόλοιπα ηφαίστεια ιλύος της περιοχής - Amsterdam MV, σχετίζεται με τους νηριτικούς ασβεστόλιθους της νοτιοανατολικής Ελλάδας (Καστελόριζο και Δωδεκάνησα) και της νοτιοδυτικής Τουρκίας (Bey Dağları) ενώ το Kazan MV σχετίζεται με το οφιολιθικό σύμπλεγμα Antalya Nappes της νοτιοδυτικής Τουρκίας (Perissoratis 2005).

Τα δεδομένα που υπάρχουν για τις συγκεντρώσεις του μεθανίου σε κάθε ηφαίστεια δεν επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, καθώς κάποιο ποσό μεθανίου, απελευθερώνεται από τα ιζήματα λόγω της αποσυμπίεσης κατά τη δειγματοληψία. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στους συγκεκριμένους πυρήνες έδειξαν ότι στο Kazan MV υπήρχε υψηλότερη συγκέντρωση μεθανίου σε σχέση με το Amsterdam MV. Ωστόσο, τα δεδομένα από δειγματολήπτες που διατηρούν την *in situ* πίεση και επιτρέπουν τη σταδιακή

αποσυμπίεση του ιζήματος και μέτρηση του παραγόμενου όγκου μεθανίου, έδειξαν διπλάσια περιεκτικότητα σε μεθάνιο (ελεύθερο και δεσμευμένο) των ιζημάτων του Amsterdam MV σε σχέση με το Kazan MV (Perissoratis 2005). Η περιεκτικότητα σε μεθάνιο των ιζημάτων δεν μπορεί να αντιστοιχηθεί με τη γεωλογική ενεργότητα αυτών (κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας) καθώς το μεγάλο μέρος του μετρούμενου μεθανίου βρίσκεται με τη μορφή των μεθανιοϋδριτών.

Για τη γεωλογική ενεργότητα των δύο ηφαιστειών λύος, καθώς δεν υπάρχουν τιμές ροής μεθανίου, έχουν διατυπωθεί διαφορετικές υποθέσεις. Δεδομένα συγκέντρωσης του μεθανίου και ύπαρξης νεφελειδούς στρώματος στο νερό του πυθμένα συγκλίνουν στη διατύπωση θεωριών για υψηλότερη ενεργότητα του Amsterdam MV (Charlou *et al.* 2003, Zitter 2006) ενώ άλλα δεδομένα, όπως οι τιμές του μεθανίου στα επιφανειακά ιζήματα του Kazan MV πιθανολογούν υψηλότερη ενεργότητα του Kazan MV (Perissoratis 2005). Γεωλογική ενεργότητα, ωστόσο, δεν αντικατοπτρίζει και αντίστοιχη βιολογική ενεργότητα καθώς πολύ υψηλές τιμές ροής μεθανίου, όπως στο κέντρο του ηφαιστείου λύος Haakon Mosby (Niemann *et al.* 2006b), δε φαίνεται να υποστηρίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών που διενεργούν AOM και των αντίστοιχων χημειοσυνθετικών κοινοτήτων.

Τα γεωλογικά και γεωχημικά δεδομένα επίσης υποδεικνύουν διαφορετικό ιστορικό εκρήξεων και ροών λύος, μεταξύ των δύο ηφαιστειών λύος (Perissoratis 2005). Ωστόσο το ακριβές ιστορικό εκρήξεων είναι αδύνατον να προσδιοριστεί. Επιπλέον, λόγω του μεγάλου μεγέθους του, το Amsterdam MV είναι πιθανό να παρουσιάζει μεγαλύτερη ετερογένεια στη γεωλογική ενεργότητα και στο ιστορικό εκρήξεων και ροών.

Έχει βρεθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού της AOM και της συγκέντρωσης του μεθανίου, ωστόσο τα μεθανιότροφα Archaea φαίνεται να μπορούν να παραμείνουν ενεργά υπό μεγάλο εύρος μεθανίου και έχουν δυνατότητα επιβίωσης έλλειψης αυτού για μεγάλη χρονική περίοδο (Wegener & Boetius 2008) που ενισχύει επιπλέον την άποψη (Valentine 2007) ότι τα Archaea έχουν προσαρμοστεί σε παρατεταμένα (χρόνια) ενεργειακή ένταση και οι μηχανισμοί που διαθέτουν για την εξοικονόμηση ενέργειας τους επιτρέπει να διαβιούν σε περιβάλλοντα όπου η διαθεσιμότητα ενέργειας μπορεί να μεταβάλλεται (π.χ. η ροή και η συγκέντρωση του μεθανίου).

Στα Bacteria η συνύπαρξη πολλών φυλοτύπων, αυτότροφου και ετερότροφου τρόπου ζωής, έχει ως αποτέλεσμα την εκμετάλλευση όλων των διαθέσιμων ενεργειακών πηγών. Όμως, τα δύο ηφαιστεια λύος έχουν διαφορές στο οργανικό περιεχόμενο, με τις τιμές του οργανικού άνθρακα [Corg] που μετρήθηκαν να ξεπερνούν το 0.3% στα πρώτα 25 cmbsf του Amsterdam MV, ενώ για το Kazan MV οι τιμές να κυμαίνονται στο 0.2% παρουσιάζοντας μέγιστο (0,35%) στο βάθος των 7 cmbsf (Perissoratis 2005). Επομένως η διαφορά των βιοκοινοτήτων των Bacteria πιθανά αντανακλά τη διαφορά στην περιεκτικότητα (ή και στην ποιότητα) του Corg ως διαθέσιμη πηγή τροφής.

Επίσης, όσον αφορά την AOM, υπάρχουν ενδείξεις ότι και άλλες διεργασίες εκτός της θειικής αναγωγής μπορούν να συμμετέχουν στην πραγματοποίησή της με μεγαλύτερη ενεργειακή απόδοση (Beal *et al.* 2009), όπως αναγωγή ιόντων Mn ή Fe. Η περιεκτικότητα σε μέταλλα, των επιφανειακών ιζημάτων των ηφαιστειών λύος της ανατολικής Μεσογείου, παρουσιάζεται εμπλουτισμένη σε S

και Fe σε σχέση με τα πελαγικά ιζήματα της ίδιας περιοχής. Ιδιαίτερα τα επιφανειακά ιζήματα του Amsterdam MV δίνουν την εικόνα πιο αναγωγικού περιβάλλοντος, τόσο σε σχέση με τα υπόλοιπα ηφαίστεια όσο και με τα πελαγικά ιζήματα (Perissoratis 2005), ενώ φυλότυποι που θα μπορούσαν δυνητικά να μετέχουν σε αυτές τις διεργασίες υπάρχουν στα ιζήματα σύμφωνα με τις φυλογενετικές αναλύσεις των Bacteria.

Γενικά, τα Archaea που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του μεθανίου ανήκουν σε μικρό αριθμό ομάδων που έχουν φυλογενετική συγγένεια (μικρή ή μεγάλη) με τα Methanosarcinales και η λειτουργία τους στο οικοσύστημα σχετίζεται κατά κύριο λόγο με την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου ή/και τη

μεθανιογένεση, τα Bacteria που συνδέονται με αυτά τα περιβάλλοντα παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα. Σύμφωνα με τα όσα βρέθηκαν σε αυτή την εργασία αλλά και όσα ήταν ήδη γνωστά τα Bacteria έχουν ποικίλους οικοφυσιολογικούς ρόλους: δρουν συντροφικά στη διενέργεια της AOM, οξειδώνουν αερόβια το μεθάνιο, οξειδώνουν το θείο καιθειούχες ενώσεις και ανάγουν τα θειικά και άλλα μεταλλικά ιόντα σε συνδυασμό ή όχι με την AOM. Σε κάθε μία από αυτές τις οικοφυσιολογικές λειτουργίες του οικοσυστήματος συνήθως εμπλέκονται διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες Bacteria (που σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να ανήκουν ακόμα και σε διαφορετικά φύλα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Πρωταρχικός στόχος αυτής της διατριβής ήταν η καταγραφή και ο χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα δύο πιο ενεργά ηφαίστεια ιλύος της περιοχής του Αναξίμανδρου, Amsterdam και Kazan, στην ανατολική Μεσόγειο. Η γνώση αυτή ήταν το πρώτο και βασικότερο βήμα στην προσπάθεια διερεύνησης της αλληλεπίδρασης των οργανισμών με τις υπόλοιπες βιοτικές και αβιοτικές συνιστώσες του περιβάλλοντος. Η υψηλής ανάλυσης κατακόρυφη κατανομή των μικροοργανισμών σε ιζήματα όπου παρατηρείται έντονη διαβάθμιση γεωχημικών παραγόντων που αποτελούν ταυτόχρονα και σημαντικές πηγές ενέργειας, όπως το μεθάνιο, τα θειικά και θειούχα ιόντα, προσέφερε επιπλέον ενδείξεις για τη λειτουργία, τη φυσιολογία των οργανισμών και το ρόλο τους στο οικοσύστημα.

Η διερεύνηση ορισμένων διεργασιών, όπως είναι η Αναερόβια Οξείδωση του Μεθανίου (AOM) απαιτεί διεπιστημονική έρευνα και σημαντικές πληροφορίες αντλούνται από τη μελέτη των οικοσυστημάτων στα οποία διενεργείται η AOM. Η μελέτη των βιοτικών παραγόντων ενός τέτοιου οικοσυστήματος μέσω της πολυφασικής προσέγγισης προσφέρει πολύπλευρη εικόνα για αυτό ενώ παράλληλα επιτρέπει την αξιολόγηση των επιμέρους μεθοδολογιών.

Το κυριότερο συμπέρασμα που προέκυψε από αυτή τη διατριβή είναι ότι η AOM είναι ενεργή διεργασία στα ιζήματα ιλύος που μελετήθηκαν. Στο αποτέλεσμα αυτό συγκλίνουν τα δεδομένα από όλες τις προσεγγίσεις που πραγματοποιήθηκαν. Η φυλογενετική ανάλυση οδήγησε στην

ταυτοποίηση φυλοτύπων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του μεθανίου και κυρίως στην AOM αλλά και συνοδές διεργασίες, όπως η θειική αναγωγή και η οξείδωση θειούχων ενώσεων. Αντίστοιχα ανιχνεύθηκαν χαρακτηριστικοί λιπιδιακοί βιοδείκτες που υποδηλώνουν την ύπαρξη ενεργών βιοκοινοτήτων. Παράλληλα, οι κατακόρυφες κατανομές των λιπιδιακών βιοδεικτών αντικατοπτρίζουν τα βάθη στα οποία λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες αυτές.

Θεωρώντας ότι οι θέσεις δειγματοληψίας αντιστοιχούν σε γεωλογικά ενεργές θέσεις των αντίστοιχων ηφαιστειών (οπότε είναι εφικτή η μεταξύ τους σύγκριση) ένα άλλο συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι τα δύο υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος, Amsterdam και Kazan, αν και βρίσκονται στην ίδια γεωγραφική περιοχή, διαφοροποιούνται τόσο ως προς τη σύσταση των βιοκοινοτήτων τους όσο και ως προς την ενεργότητα αυτών των βιοκοινοτήτων.

Το μεθάνιο είναι πιθανότατα ο πρωταρχικός παράγοντας που διαμορφώνει τις βιοκοινοότητες των Archaea αλλά διάφοροι άλλοι παράγοντες, που δεν μπορούν προς το παρόν να εκτιμηθούν, οδηγούν στην επικράτηση συγκεκριμένων φυλοτύπων. Σε αντίθεση με τα Archaea, τα Bacteria που ανιχνεύθηκαν εμφανίζουν υψηλή ποικιλότητα και ποικίλους οικοφυσιολογικούς ρόλους στο οικοσύστημα.

Υποθέσεις για την τύχη των μεθανιοϋδριτών, του εκλυόμενου μεθανίου και τη δράση-αντίδραση των μικροοργανισμών στις πλανητικές, κλιματικές και γενικότερες μεταβολές που εξελίσσονται είναι αδόκιμο να

γίνονται με βάση τα όσα διερευνήθηκαν μέσω αυτής της εργασίας αλλά ακόμα και όσα είναι μέχρι σήμερα γνωστά για αυτά τα συστήματα. Οι προσπάθειες των επιστημόνων έχουν επικεντρωθεί στα εξής ερωτήματα:

- Πόσο μεθάνιο παράγεται στον πυθμένα των θαλασσών και πόσο κατακρατείται μέσω της μικροοργανισμικής οξείδωσης; Πόσο μεθάνιο διαφεύγει στη στήλη του νερού και πόσο εκλύεται στην ατμόσφαιρα;
- Ποια είναι η ετερογένεια των πλούσιων σε μεθάνιο συστημάτων (ηφαιστειών υλός, μεθανιοϋδριτών, ψυχρών αναβλύσεων); Πώς αλλάζουν αυτά με το χρόνο;
- Ποιοί περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν τις ομάδες των μεθανιότροφων που θα επικρατήσουν; Ποιά είναι η φυσιολογία των μικροοργανισμών αυτών;

Η συνεχώς εξελισσόμενη τεχνολογία των υποβρύχιων συστημάτων με συνδυασμό της υψηλής ανάλυσης χαρτογράφησης του θαλάσσιου πυθμένα, των μετρήσεων *in situ* της συγκέντρωσης και της διακίνησης των

υποστρωμάτων καθώς και του υπολογισμού των *in situ* ροών αναμένεται να προσφέρει δυνατότητα ακριβών εκτιμήσεων της μικροοργανισμικής ενεργότητας, της περιβαλλοντικής ετερογένειας και της εξέλιξης των συστημάτων στο βάθος του χρόνου.

Ο χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών σε όλα τα συστήματα αυτά που έχουν ανακαλυφθεί και συνεχώς ανακαλύπτονται είναι επιβεβλημένη καθώς καινούριες ομάδες μικροοργανισμών είναι πιθανό να αναγνωριστούν. Παράλληλα, απομόνωση των μικροοργανισμών που πιστεύεται ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό του μεθανίου θα επιτρέψει την πληρέστερη μελέτη της φυσιολογίας αυτών. Εναλλακτικά, η χρήση ίζηματων, από τα πλούσια σε μεθάνιο περιβάλλοντα, σε εργαστηριακές συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον ή και οι εμπλουτισμένες καλλιέργειες αναμένεται να δώσουν περισσότερα στοιχεία για τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα ιζήματα αυτά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το έργο συγχρηματοδοτήθηκε:

- 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
- 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
- και από τον Ιδιωτικό Τομέα

στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

Η διδακτορική διατριβή υποστηρίχθηκε επιπλέον από την Ευρωπαϊκή Ένωση:

- πρόγραμμα ANAXIMANDER (EVK3-CT-2002-00068)
- πρόγραμμα HERMES (GOCE-CT-2005-511234-1)

BIBΛIOΓPAΦIA

- Alain K, Holler T, Musat F, Elvert M, Treude T & Krüger M (2006) Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon- discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environmental Microbiology* **8**: 574-590.
- Aller JY & Kemp PF (2008) Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 74-87.
- Aloisi G, Bouloubassi I, Heijs SK, Pancost RD, Pierre C, Sinninghe Damsté JS, Gottschal JC, Forney LJ & Rouchy JM (2002) CH₄-consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps. *Earth and Planetary Science Letters* **203**: 195-203.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Baas Beeking LGM (1934) *Geobiologie of Inleiding Tot de Milieukunde*. Van Stockum & Zoon, The Hague.
- Baer ML, Ravel J, Chun J, Hill RT & Williams HN (2000) A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 219-224.
- Banning N, Brock F, Fry JC, Parkes RJ, Hornibrook ERC & Weightman AJ (2005) Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environmental Microbiology* **7**: 947-960.
- Barajas-Aceves M, Hassanb M, Tinocob R & Vazquez-Duhaltb R (2002) Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods* **50**: 227-236.
- Barber AJ, Tjokrosoepetro S & Charlton TR (1986) Mud volcanoes, shale diapirs, wrench faults and melanges in accretionary complexes, Eastern Indonesia. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin* **70**: 1729-1741.
- Barber T & Brown K (1988) Mud diapirism: the origin of melanges in accretionary complexes? *Geology Today* **4**: 89-94.
- Beal EJ, House CH & Orphan VJ (2009) Manganese- and iron- dependent marine methane oxidation. *Science* **325**: 184-187.
- Beijerinck MW (1913) De infusies en de ontdekking der bacterien. *Jaarboek van de Koninklijke Akademie van Wetenschappen* 1-28.
- Bent SJ & Forney LJ (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME Journal* **2**: 689-695.
- Beyer H & Walter W (1997) *Organic Chemistry: A Comprehensive Degree Text & Source Book*. Horwood Engineering Science Series.
- Bian (1994) Isotopic biogeochemistry of individual compounds in a modern coastal marine sediment MSc Thesis, Indiana University, Bloomington.
- Bian L, Hinrichs KU, Xie T, Brassell SC, Iversen N, Fossing H, Jørgensen BB & Hayes JM (2001) Algal and archaeal polyisoprenoids in a recent marine sediment: Molecular isotopic evidence for anaerobic oxidation of methane.

- Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **2**: 1023.
- Biddle JF, Lipp JS, Lever MA *et al.* (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3846-3851.
- Biddle JF, Fitz-Gibbon S, Schuster SC, Brenchley JE & House CH (2008) Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10583-10588.
- Blumenberg M, Seifert R, Reitner J, Pape T & Michaelis W (2004) Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11111-11116.
- Blumenberg M, Seifert R, Nauhaus K, Pape T & Michaelis W (2005) In vitro study of lipid biosynthesis in an anaerobically methane-oxidizing microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4345-4351.
- Boetius A, Ravenschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gleseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U & Pfannkuche O (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Bohrmann G, Greinert J, Suess E & Torres M (1998) Authigenic carbonates from the Cascadia subduction zone and their relation to gas hydrate stability. *Geology* **26**: 647-650.
- Bohrmann G & Torres ME (2006) Gas hydrates in marine sediments. In: *Marine Geochemistry*, Schulz HD & Zabel M (eds.), 418-512. Springer
- Borowski WS, Hoehler TM, Alperin MJ, Rodriguez NM & Paull CK (2000) Significance of anaerobic methane oxidation in methane-rich sediments overlying the Blake Ridge gas hydrates. *Proceedings of the Ocean Drilling Program: Scientific Results* **164**: 87-99.
- Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, De Graaf W, Pel R, Parkes RJ & Cappenberg TE (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. *Nature* **392**: 801-804.
- Boschker HTS & Middelburg JJ (2002) Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS microbial ecology* **40**: 85-95.
- Boucher Y (2007) Lipids: Biosynthesis, function and evolution. In: *Archaea: Molecular and Cellular Biology*, Cavicchioli R (ed.), 341-353. AMS Press.
- Bouloubassi I, Aloisi G, Pancost RD, Hopmans E, Pierre C & Sinninghe Damsté JS (2006) Archaeal and bacterial lipids in authigenic carbonate crusts from eastern Mediterranean mud volcanoes. *Organic Geochemistry* **37**: 484-500.
- Bowman JP & McCuaig RD (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2463-2483.
- Bowman JP, McCammon SA & Dann AL (2005) Biogeographic and quantitative analyses of abundant uncultivated γ -proteobacterial clades from marine sediment. *Microbial Ecology* **49**: 451-460.
- Brocks JJ, Logan GA, Buick R & Summons RE (1999) Archean molecular fossils and

- the early rise of eukaryotes. *Science* **285**: 1033-1036.
- Brown K & Westbrook GK (1988) Mud diapirism and subcretion in the Barbados Ridge Accretionary Complex: the role of fluids in accretionary processes. *Tectonics* **7**: 613-640.
- Burton NP & Norris PR (2000) Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: Environmental rDNA analysis. *Extremophiles* **4**: 315-320.
- Cai P, Huang Q-y, Lu Y-d, Chen W-l, Jiang D-h & Liang W (2007) Amplification of plasmid DNA bound on soil colloidal particles and clay minerals by the polymerase chain reaction. *Journal of Environmental Sciences* **19**: 1326-1329.
- Castro H, Ogram A & Reddy KR (2004) Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida everglades. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6559-6568.
- Chamot-Rooke N, Lallemand SJ, Le Pichon X *et al.* (1992) Tectonic context of fluid venting at the toe of the eastern Nankai accretionary prism: Evidence for a shallow detachment fault. *Earth and Planetary Science Letters* **109**: 319-332.
- Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ & Fredrickson JK (1998) Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol. *Microbial Ecology* **36**: 37-50.
- Charcosset J-Y & Chauvet E (2001) Effect of Culture Conditions on Ergosterol as an Indicator of Biomass in the Aquatic Hyphomycetes. *Applied Environmental Microbiology* **67**: 2051-2055.
- Charlou JL & Donval JP (1993) Hydrothermal methane venting between 12B°N and 26B°N along the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Geophysical Research* **98**: 9625-9642.
- Charlou JL, Donval JP, Zitter T, Roy N, Jean-Baptiste P, Foucher JP & Woodside J (2003) Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the eastern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **50**: 941-958.
- Chin KJ, Lukow T, Stubner S & Conrad R (1999) Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30B°C). *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 313-326.
- Chin KJ, Lueders T, Friedrich MW, Klose M & Conrad R (2004) Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microbial Ecology* **47**: 59-67.
- Chouari R, Le Paslier D, Dauga C, Daegelen P, Weissenbach J & Sghir A (2005) Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2145-2153.
- Cita MB, Ryan WBF & Paggi L (1981) Prometheus mud-breccia: An example of shale diapirism in the Western Mediterranean Ridge. *Annales Geologiques des Pays Helleniques* **30**: 543-570.
- Conrad R, Klose M & Noll M (2009) Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change. *Environmental Microbiology* **11**: 1844-1853.
- Coolen MJL, Cypionka H, Sass AM, Sass H & Overmann J (2002) Ongoing modification of Mediterranean

- pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. *Science* **296**: 2407-2410.
- Corinaldesi C, Danovaro R & Dell'Anno A (2005) Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 46-50.
- Corinaldesi C, Beolchini F & Dell'Anno A (2008) Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: Implications for the preservation of gene sequences. *Molecular Ecology* **17**: 3939-3951.
- Crosby LD & Criddle CS (2003) Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* **34**: 790-802.
- Curtis TP & Sloan WT (2004) Prokaryotic diversity and its limits: Microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 221-226.
- D'Hondt S, Rutherford S & Spivack AJ (2002) Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science* **295**: 2067-2070.
- Daniels L, Sparling R & Sprott GD (1984) The bioenergetics of methanogenesis. *BBA Reviews On Bioenergetics* **768**: 113-163.
- De Rosa M, Gambacorta A & Gliozzi A (1986) Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews* **50**: 70-80.
- De Rosa M & Gambacorta A (1988) The lipids of archaeobacteria. *Progress in Lipid Research* **27**: 153-175.
- Dell'Anno A & Danovaro R (2005) Ecology: Extracellular DNA plays a key role in deep-sea ecosystem functioning. *Science* **309**: 2179.
- Denman SE, Tomkins NW & McSweeney CS (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 313-322.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsen N, Piceno YM, Phan R & Andersen GL (2006) NAST: A multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* **34**.
- Dhillon A, Teske A, Dillon J, Stahl DA & Sogin ML (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas basin. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2765-2772.
- Dhillon A, Lever M, Lloyd KG, Albert DB, Sogin ML & Teske A (2005) Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4592-4601.
- Dickens GR (2003) Rethinking the global carbon cycle with a large, dynamic and microbially mediated gas hydrate capacitor. *Earth and Planetary Science Letters* **213**: 169-183.
- Dimitrov LI (2002) Mud volcanoes-the most important pathway for degassing deeply buried sediments. *Earth-Science Reviews* **59**: 49-76.
- Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK & Pace NR (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and*

- Environmental Microbiology* **64**: 3869-3877.
- Durisch-Kaiser E, Klausner L, Wehrli B & Schubert C (2005) Evidence of intense archaeal and bacterial methanotrophic activity in the Black Sea water column. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8099-8106.
- Earl J, Hall G, Pickup RW, Ritchie DA & Edwards C (2003) Analysis of methanogen diversity in a hypereutrophic lake using PCR-RFLP analysis of *mcr* sequences. *Microbial Ecology* **46**: 270-278.
- Eller G, Stubner S & Frenzel P (2001) Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiology Letters* **198**: 91-97.
- Eller G, Känel L & Krüger M (2005) Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Pluß see. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8925-8928.
- Elvert M, Suess E & Whiticar MJ (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: Superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C₂₀ and C₂₅ irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295-300.
- Elvert M, Suess E, Greinert J & Whiticar MJ (2000) Archaea mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediments at cold seeps of the eastern Aleutian subduction zone. *Organic Geochemistry* **31**: 1175-1187.
- Elvert M, Boetius A, Knittel K & Jørgensen BB (2003) Characterization of specific membrane fatty acids as chemotaxonomic markers for sulfate-reducing bacteria involved in anaerobic oxidation of methane. *Geomicrobiology Journal* **20**: 403-419.
- Elvert M, Hopmans EC, Treude T, Boetius A & Suess E (2005) Spatial variations of methanotrophic consortia at cold methane seeps: Implications from a high-resolution molecular and isotopic approach. *Geobiology* **3**: 195-209.
- Elvert M & Niemann H (2008) Occurrence of unusual steroids and hopanoids derived from aerobic methanotrophs at an active marine mud volcano. *Organic Geochemistry* **39**: 167-177.
- Englezos P (1992) Computation of the incipient equilibrium carbon dioxide hydrate formation conditions in aqueous electrolyte solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **31**: 2232-2237.
- Etheridge DM, Steele LP, Francey RJ & Langenfelds RL (1998) Atmospheric methane between 1000 A.D. and present: Evidence of anthropogenic emissions and climatic variability. *Journal of Geophysical Research D: Atmospheres* **103**: 15979-15993.
- Fang J, Kato C, Sato T, Chan O & McKay D (2004) Biosynthesis and dietary uptake of polyunsaturated fatty acids by piezophilic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology* **137**: 455-461.
- Fang J, Uhle M, Billmark K, Bartlett DH & Kato C (2006) Fractionation of carbon isotopes in biosynthesis of fatty acids by a piezophilic bacterium *Moritella japonica* strain DSK1. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**: 1753-1760.
- Fang JS, Barcelona MJ & Semrau JD (2000) Characterization of methanotrophic bacteria on the basis of intact phospholipid profiles. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 67-72.

- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferrante G, Richards JC & Sprott GD (1990) Structures of polar lipids from the thermophilic, deep-sea archaeobacterium *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry and Cell Biology* **68**: 274-283.
- Ferry JG & Kestead KA (2007) Methanogenesis. In: *Archaea: Molecular and Cellular Biology*, Cavicchioli R (ed.), 288-314. AMS Press.
- Fiala-Médioni A & Felbeck H (1990) Autotrophic processes in invertebrate nutrition: Bacterial symbiosis in bivalve molluscs. *Comparative Physiology* **5**: 49-69.
- Fiala-Médioni A, Sibuet M, Gottschal JC & Mariotti A (2001) Chemosynthesis-based communities associated with fluids in deep Mediterranean mud-volcanoes. *Proceedings, CIESM Conference*.
- Fisher CR (1995) Toward an appreciation of hydrothermal-vent animals: Their environment, physiological ecology, and tissue stable isotope values. *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions* **91**: 297-316.
- Forselius S, Dyrssen D & Yhlen B (1999) Determination of hydrogen sulfide. In: *Method of Seawater Analysis, 2nd*. Grasshoff K, Ehrhardt M & Kremling K, (eds.), 91-100. Wiley.
- Fossing H, Gallardo VA, Jorgensen BB *et al.* (1995) Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca*. *Nature* **374**: 713-715.
- Fowler SR, Mildenhall J, Zalova S, Riley G, Elsley G, Desplanques A & Guliyev F (2000) Mud volcanoes and structural development on Shah Deniz. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **28**: 189-206.
- Friedmann HC, Klein A & Thauer RK (1990) Structure and function of the nickel porphinoid, coenzyme F430, and of its enzyme, methyl coenzyme M reductase. *FEMS Microbiology Reviews* **87**: 339-348.
- Gagosian RB, Smith SO, Lee C, Farrington JW & Frew NM (1980) Steroid transformations in Recent marine sediments. *Physics and Chemistry of The Earth* **12**: 407-419.
- Gallardo VA, Carrasco FD, Roa R & Canete JI (1995) Ecological patterns in the benthic macrobiota across the continental shelf off Central Chile. *Ophelia* **40**: 167-188.
- Garrity GM, Winters M & Searles DB (2001) Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed, Rel 1.0*.
- Gaston K & Spicer J (2003) *Biodiversity: An introduction, 2nd Edition*. Blackwell publishing.
- Geissinger O, Herlemann DPR, Morschel E, Maier UG & Brune A (2009) The Ultramicrobacterium "*Elusimicrobium minutum*" gen. nov., sp. nov., the First Cultivated Representative of the Termite Group 1 Phylum. *Applied Environmental Microbiology* **75**: 2831-2840.
- Ginsburg GD & Soloviev VA (1994) Mud volcano gas hydrates in the Caspian Sea. *Bulletin of the Geological Society of Denmark* **41**: 95-100.
- Girguis PR, Orphan VJ, Hallam SJ & DeLong EF (2003) Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5472-5482.

- Girguis PR, Cozen AE & DeLong EF (2005) Growth and population dynamics of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3725-3733.
- Goffredi SK, Wilpiseski R, Lee R & Orphan VJ (2008) Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME Journal* **2**: 204-220.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.
- Graue K (2000) Mud volcanoes in deepwater Nigeria. *Marine and Petroleum Geology* **17**: 959-974.
- Grossman EL, Cifuentes LA & Cozzarelli IM (2002) Anaerobic methane oxidation in a landfill-leachate plume. *Environmental Science and Technology* **36**: 2436-2442.
- Guckert JB, Antworth CP, Nichols PD & White DC (1985) Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiology Letters* **31**: 147-158.
- Guckert JB, Hood MA & White DC (1986) Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 794-801.
- Guezennec J & Fiala-Medioni A (1996) Bacterial abundance and diversity in the Barbados trench determined by phospholipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **19**: 83-93.
- Guezennec J, Ortega-Morales O, Raguenes G & Geesey G (1998) Bacterial colonization of artificial substrate in the vicinity of deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiology Ecology* **26**: 89-99.
- Guezennec JG, Dussauze J, Bian M, Rocchiccioli F, Ringelberg D, Hedrick DB & White DC (1996) Bacterial community structure in sediments from Guaymas basin, Gulf of California, as determined by analysis of phospholipid ester-linked fatty acids. *Journal of Marine Biotechnology* **4**: 165-175.
- Gulledge J, Ahmad A, Steudler PA, Pomerantz WJ & Cavanaugh CM (2001) Family- and Genus- level 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for ecological studies of methanotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4726-4733.
- Haese RR, Meile C, Van Cappellen P & De Lange GJ (2003) Carbon geochemistry of cold seeps: Methane fluxes and transformation in sediments from Kazan mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *Earth and Planetary Science Letters* **212**: 361-375.
- Hales BA, Edwards C, Ritchie DA, Hall G, Pickup RW & Saunders JR (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 668-675.
- Hall BG (2001) *Phylogenetic trees made easy*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hallam SJ, Girguis PR, Preston CM, Richardson PM & DeLong EF (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5483-5491.

- Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, Detter JC, Rokhsar D, Richardson PH & DeLong EF (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.
- Hammer Ø, Harper DAT & Ryan PD (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**.
- Hammerschmidt EG (1934) Formation of gas hydrates in natural gas transmission lines. *Industrial and Engineering Chemistry* **26**: 851-855.
- Hanson RS & Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* **60**: 439-471.
- Harms G, Zengler K, Rabus R, Aeckersberg F, Minz D, Rosselló-Mora R & Widdel F (1999) Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 999-1004.
- Harris JK, Kelley ST & Pace NR (2004) New Perspective on Uncultured Bacterial Phylogenetic Division OP11. *Applied Environmental Microbiology* **70**: 845-849.
- Harrison BK, Zhang H, Berelson W & Orphan VJ (2009) Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1487-1499.
- Härtner T, Straub KL & Kannenberg E (2005) Occurrence of hopanoid lipids in anaerobic *Geobacter* species. *FEMS Microbiology Letters* **243**: 59-64.
- Heijs SK, Sinninghe Damsté JS & Forney LJ (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology* **54**: 47-56.
- Heijs SK, Aloisi G, Bouloubassi I, Pancost RD, Pierre C, Sinninghe Damsté JS, Gottschal JC, Van Elsas JD & Forney LJ (2006) Microbial community structure in three deep-sea carbonate crusts. *Microbial Ecology* **52**: 451-462.
- Heijs SK, Haese RR, Van Der Wielen PWJJ, Forney LJ & Van Elsas JD (2007) Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microbial Ecology* **53**: 384-398.
- Heijs SK, Laverman AM, Forney LJ, Hardoim PR & Van Elsas JD (2008) Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 362-377.
- Henry P, Le Pichon X, Lallemand S *et al.* (1996) Fluid flow in and around a mud volcano field seaward of the Barbados accretionary wedge: Results from Manon cruise. *Journal of Geophysical Research B: Solid Earth* **101**: 20297-20323.
- Higgins GE & Saunders JB (1974) Mud volcanoes - Their nature and origin. *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft von Basel* **84**: 101-152.
- Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA & Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 1-11.
- Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewert PG & DeLong EF (1999) Methane-consuming

- archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hinrichs KU, Pancost RD, Summons RE, Sprott GD, Sylva SP, Sinninghe Damsté JS & Hayes JM (2000a) Mass spectra of sn-2-hydroxyarchaeol, a polar-lipid biomarker for anaerobic methanotrophy. *Geochemistry Geophysics Geosystems* **1**: 1025.
- Hinrichs KU, Summons RE, Orphan V, Sylva SP & Hayes JM (2000b) Molecular and isotopic analysis of anaerobic methaneoxidizing communities in marine sediments. *Organic Geochemistry* **31**: 1685-1701.
- Hinrichs KU (2001) A molecular recorder of methane hydrate destabilization. *Geochemistry Geophysics Geosystems* **2**: 1029.
- Hinrichs KU & Boetius A (2002) The anaerobic oxidation of methane: New insights in microbial ecology and biogeochemistry. *Ocean Margin Systems* 457-477.
- Hoehler TM, Alperin MJ, Albert DB & Martens CS (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**: 451-463.
- Holland CW, Etiope G, Milkov AV, Michelozzi E & Favali P (2003) Mud volcanoes discovered offshore Sicily. *Marine Geology* **199**: 1-6.
- Hong S-H, Bunge J, Jeon S-O & Epstein SS (2006) Predicting microbial species richness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 117-122.
- Horita J & Berndt ME (1999) Abiogenic methane formation and isotopic fractionation under hydrothermal conditions. *Science* **285**: 1055-1057.
- Hovland M, Hill A & Stokes D (1997) The structure and geomorphology of the Dashgil mud volcano, Azerbaijan. *Geomorphology* **21**: 1-15.
- Hovland M (2000) Are there commercial deposits of methane hydrates in ocean sediments? *Energy Exploration and Exploitation* **18**: 339-347.
- Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, König H, Rachel R, Rockinger I, Fricke H & Stetter KO (1992) *Aquifex pyrophilus* gen.nov. sp.nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 340-351.
- Hugenholtz P, Goebel BM & Pace NR (1998a) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**: 4765-4774.
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL & Pace NR (1998b) Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology* **180**: 366-376.
- Inagaki F, Suzuki M, Takai K, Oida H, Sakamoto T, Aoki K, Nealson KH & Horikoshi K (2003) Microbial Communities Associated with Geological Horizons in Coastal Subseafloor Sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7224-7235.
- Inagaki F, Takai K, Nealson KH & Horikoshi K (2004a) *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1477-1482.

- Inagaki F, Tsunogai U, Suzuki M, Kosaka A, Machiyama H, Takai K, Nunoura T, Nealson KH & Horikoshi K (2004b) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7445-7455.
- Inagaki F, Kuypers MMM, Tsunogai U *et al.* (2006a) Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14164-14169.
- Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S *et al.* (2006b) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2815-2820.
- Ivanov MK, Limonov AF & Woodside JM (1992) Geological and geophysical investigations in Mediterranean and Black Seas. *UNESCO Reports in Marine Science* **56**.
- Iversen N & Jorgensen BB (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnology & Oceanography* **30**: 944-955.
- Jacq E, Prieur D, Nichols P, White DC, Porter T & Geesey GG (1989) Microscopic examination and fatty acid characterization of filamentous bacteria colonizing substrata around subtidal hydrothermal vents. *Archives of Microbiology* **152**: 64-71.
- Jahnke LL, Stan-Lotter H, Kato K & Hochstein LI (1992) Presence of methyl sterol and bacteriohopanepolyol in an outer-membrane preparation from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of General Microbiology* **138**: 1759-1766.
- Jahnke LL, Summons RE, Dowling LM & Zahiralis KD (1995) Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: Chemical and isotopic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 576-582.
- Jarrell KF (1985) Extreme oxygen sensitivity in methanogenic archaeobacteria. *BioScience* **35**: 298.
- Jones DT, Taylor WR & Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* **8**: 275-282.
- Jørgensen BB (1982a) Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature* **296**: 643-645.
- Jørgensen BB (1982b) Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences* **298**: 543-561.
- Joye SB, Boetius A, Orcutt BN, Montoya JP, Schulz HN, Erickson MJ & Lugo SK (2004) The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chemical Geology* **205**: 219-238.
- Judd AG, Hovland M, Dimitrov LI, García Gil S & Jukes V (2002) The geological methane budget at continental margins and its influence on climate change. *Geofluids* **2**: 109-126.
- Karr EA, Ng JM, Belchik SM, Sattley WM, Madigan MT & Achenbach LA (2006)

- Biodiversity of methanogenic and other Archaea in the permanently frozen Lake Fryxell, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1663-1666.
- Kasten S & Jørgensen BB (2000) Sulfate reduction in marine sediments. In: *Marine Geochemistry*, Schulz HD & Zabel M (eds.), 263-281. Springer.
- Kelley DS (1996) Methane-rich fluids in the oceanic crust. *Journal of Geophysical Research B: Solid Earth* **101**: 2943-2962.
- Kelley DS & Früh-Green GL (1999) Abiogenic methane in deep-seated mid-ocean ridge environments: Insights from stable isotope analyses. *Journal of Geophysical Research B: Solid Earth* **104**: 10439-10460.
- Kelley DS, Karson JA, Früh-Green GL *et al.* (2005) A Serpentinite-Hosted Ecosystem: The Lost City Hydrothermal Field. *Science* **307**: 1428-1434.
- Kemp PF & Aller JY (2003) Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology* **1600**: 1-17.
- Kemp PF & Aller JY (2004) Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanography: Methods* **2**: 114-125.
- Kieft TL, Ringelberg DB & White DC (1994) Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 3292-3299.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- King GM (1992) Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. *Advances in Microbial Ecology* **12**: 431-468.
- King LL, Pease TK & Wakeham SG (1998) Archaea in black sea water column particulate matter and sediments - Evidence from ether lipid derivatives. *Organic Geochemistry* **28**: 677-688.
- Klenk H-P, Clayton RA, Tomb J-F *et al.* (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Knittel K, Boetius A, Lemke A, Eilers H, Lochte K, Pfannkuche O, Linke P & Amann R (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal* **20**: 269-294.
- Knittel K, Lösekann T, Boetius A, Kort R & Amann R (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 467-479.
- Knittel K & Boetius A (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annual Review of Microbiology* **63**: 311-334.
- Koga Y, Akagawa-Matsushita M, Ohga M & Nishihara M (1993a) Taxonomic significance of the distribution of component parts of polar etherlipids in methanogens. *Systematics and Applied Microbiology* **16**: 342-351.
- Koga Y, Nishihara M, Morii H & Akagawa-Matsushita M (1993b) Ether polar lipids of methanogenic bacteria: Structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiological Reviews* **57**: 164-182.

- Koga Y, Morii H, Akagawa-Matsushita M & Ohga M (1998) Correlation of polar lipid composition with 16S rRNA phylogeny in methanogens. Further analysis of lipid component parts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**: 230-236.
- Koga Y & Morii H (2005) Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**: 2019-2034.
- Köpke B, Wilms R, Engelen B, Cypionka H & Sass H (2005) Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 7819-7830.
- Kormas KA, Smith DC, Edgcomb V & Teske A (2003) Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microbiology Ecology* **45**: 115-125.
- Kormas KA, Meziti A, Dählmann A, De Lange GJ & Lykousis V (2008) Characterization of methanogenic and prokaryotic assemblages based on mcrA and 16S rRNA gene diversity in sediments of the Kazan mud volcano (Mediterranean Sea). *Geobiology* **6**: 450-460.
- Krüger M, Meyerdierks A, Glöckner FO *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-881.
- Kuever J, Könneke M, Galushko A & Drzyzga O (2001) Reclassification of *Desulfobacterium phenolicum* as *Desulfobacula phenolica* comb. nov. and description of strain Sax(T) as *Desulfotignum balticum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 171-177.
- Kuypers MMM, Blokker P, Erbacher J, Kinkel H, Pancost RD, Schouten S & Sinninghe Damsté JS (2001) Massive expansion of marine archaea during a mid-Cretaceous oceanic anoxic event. *Science* **293**: 92-94.
- Kvenvolden KA, Claypool GE, Threlkeld CN & Dendy Sloan E (1984) Geochemistry of a naturally occurring massive marine gas hydrate. *Organic Geochemistry* **6**: 703-713.
- Kvenvolden KA (1993a) Gas hydrates as a potential energy resource - a review of their methane content. *US Geological Survey Professional Paper* **1570**: 555-561.
- Kvenvolden KA (1993b) Gas hydrates-geological perspective and global change. *Reviews of Geophysics* **31**: 173-187.
- Kvenvolden KA & Lorenson TD (2001) The global occurrence of natural gas hydrate. *Natural Gas Hydrates: Occurrence, Distribution, and Detection* **124**: 3-18.
- Kvenvolden KA (2002) Methane hydrate in the global organic carbon cycle. *Terra Nova* **14**: 302-306.
- Lance S, Henry P, Le Pichon X, Lallemand S, Chamley H, Rostek F, Faugères JC, Gonthier E & Olu K (1998) Submersible study of mud volcanoes seaward of the Barbados accretionary wedge: Sedimentology, structure and rheology. *Marine Geology* **145**: 255-292.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* 115-175.
- Langworthy TA (1982) Lipids of bacteria living in extreme environments. *Current Topics in Membranes and Transport* **17**: 45-76.

- Langworthy TA, Holzer G, Zeikus JG & Tornabene TG (1983) Iso- and anteiso-branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 1-17.
- Langworthy TA & Pond JL (1986) Archaeobacterial lipids and chemotaxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* **7**: 253-257.
- Lanoil BD, Sassen R, La Duc MT, Sweet ST & Neilson KH (2001) Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5143-5153.
- Le Pichon X (1990) Mud volcano field seaward of the Barbados accretionary complex: a submersible survey. *Journal of Geophysical Research* **95**: 8931-8943.
- Li L, Kato C & Horikoshi K (1999a) Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan trench. *Marine Biotechnology* **1**: 391-400.
- Li L, Kato C & Horikoshi K (1999b) Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation* **8**: 659-677.
- Li YL, Peacock AD, White DC, Geyer R & Zhang CL (2007) Spatial patterns of bacterial signature biomarkers in marine sediments of the Gulf of Mexico. *Chemical Geology* **238**: 168-179.
- Limonov AF, Ivanov MK & Foucher JP (1998) Deep-towed side-scan survey of the United Nations Rise, eastern Mediterranean. *Geo-Marine Letters* **18**: 115-126.
- Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R & Amann R (1998) Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2691-2696.
- Lloyd KG, Lapham L & Teske A (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline gulf of Mexico sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7218-7230.
- Lollar SB, Westgate TD, Ward JA, Slater GF & Lacrampe-Couloume G (2002) Abiogenic formation of alkanes in the earth's crust as a minor source for global hydrocarbon reservoirs. *Nature* **416**: 522-524.
- Loncke L & Mascle J (2004) Mud volcanoes, gas chimneys, pockmarks and mounds in the Nile deep-sea fan (Eastern Mediterranean): Geophysical evidences. *Marine and Petroleum Geology* **21**: 669-689.
- López-Archilla AI, Moreira D, Velasco S & López-García P (2007) Archaeal and bacterial community composition of a pristine coastal aquifer in Doñana National Park, Spain. *Aquatic Microbial Ecology* **47**: 123-139.
- Lösekan T (2006) Molecular characterization of methanotrophic and chemoautotrophic communities at cold seeps. Thesis, University of Bremen, Bremen.
- Lösekan T, Knittel K, Nadalig T, Fuchs B, Niemann H, Boetius A & Amann R (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3348-3362.
- Louda SM & Rand TA (2002) *Native thistles: Expendable or integral to ecosystem resistance to invasion?* Princeton University Press, Princeton.

- Lueders T, Chin KJ, Conrad R & Friedrich M (2001) Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (mcrA) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* **3**: 194-204.
- Luff R & Wallmann K (2003) Fluid flow, methane fluxes, carbonate precipitation and biogeochemical turnover in gas hydrate-bearing sediments at Hydrate Ridge, Cascadia Margin: Numerical modeling and mass balances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**: 3403-3421.
- Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ & Riley PW (2002) The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521-3530.
- Lykousis V, Alexandri S, Woodside J *et al.* (2009) Mud volcanoes and gas hydrates in the Anaximander mountains (Eastern Mediterranean Sea). *Marine and Petroleum Geology* **26**: 854-872.
- MacDonald IR, Boland GS, Baker JS, Brooks JM, Kennicutt II MC & Bidigare RR (1989) Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. II. Spatial distribution of seep organisms and hydrocarbons at Bush Hill. *Marine Biology* **101**: 235-247.
- Maddox J (1994) Frontiers of ignorance. *Nature* **372**: 11-36.
- Madigan MT, Martinko JM, P. D & Parker J (2008) *Brock Biology of Microorganisms, 12th Edition*. Pearson.
- Makogon YF, Holste JC & Holditch SA (1998) Natural gas hydrates and global change. *Proceedings of the International Offshore and Polar Engineering Conference* **1**: 73-74.
- Makula RA (1978) Phospholipid composition of methane-utilizing bacteria. *Journal of Bacteriology* **134**: 771-777.
- Manne AS & Richels RG (2001) An alternative approach to establishing trade-offs among greenhouse gases. *Nature* **410**: 675-677.
- Martens CS & Berner RA (1974) Methane production in the interstitial waters of sulfate depleted marine sediments. *Science* **185**: 1167-1169.
- Martin H, J3rg E & Franco W (2007) Residual polymerase activity-induced bias in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **9**: 555-559.
- Martin H & Franco W (2008) Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. *FEMS Microbiology Ecology* **63**: 249-260.
- Matsui GY, Ringelberg DB & Lovell CR (2004) Sulfate-reducing bacteria in tubes constructed by the marine infaunal polychaete *Diopatra cuprea*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7053-7065.
- Maymo-Gatell X, Chien YT, Gossett JM & Zinder SH (1997) Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**: 1568-1571.
- Mazurenko LL, Soloviev VA, Belenkaya I, Ivanov MK & Pinheiro LM (2002) Mud volcano gas hydrates in the Gulf of Cadiz. *Terra Nova* **14**: 321-329.
- McCaffrey MA, Farrington JW & Repeta DJ (1989) Geochemical implications of the lipid composition of *Thioploca* spp. from the Peru upwelling region-15B°S. *Organic Geochemistry* **14**: 61-68.

- Meyerdierks A, Kube M, Lombardot T, Knittel K, Bauer M, Glöckner FO, Reinhardt R & Amann R (2005) Insights into the genomes of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology* **7**: 1937-1951.
- Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K *et al.* (2002) Microbial reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013-1015.
- Milkov AV (2000) Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates. *Marine Geology* **167**: 29-42.
- Milkov AV & Sassen R (2002) Economic geology of offshore gas hydrate accumulations and provinces. *Marine and Petroleum Geology* **19**: 1-11.
- Milkov AV & Sassen R (2003) Preliminary assessment of resources and economic potential of individual gas hydrate accumulations in the Gulf of Mexico continental slope. *Marine and Petroleum Geology* **20**: 111-128.
- Mills HJ, Hodges C, Wilson K, MacDonald IR & Sobecky PA (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* **46**: 39-52.
- Mills HJ, Martinez RJ, Story S & Sobecky PA (2005) Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: Comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3235-3247.
- Morisita M (1959) Measuring of interspecific association and similarity between communities. *Memoirs of the Faculty of Science Kyushu University Series E (Biology)* **3**: 65-80.
- Mussmann M, Ishii K, Rabus R & Amann R (2005) Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology* **7**: 405-418.
- Nakaya T, Kobayashi K, Akagi T, Kimura K & Tai H (2000) Continuous monitoring of the methane concentration in the atmosphere by IR spectrometry with a 1.66- μm Diode laser. *Analytical Sciences* **16**: 1211-1214.
- Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C & Summers AO (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7118-7122.
- Nauhaus K, Boetius A, Krüger M & Widdel F (2002) In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology* **4**: 296-305.
- Nauhaus K, Treude T, Boetius A & Krüger M (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: A comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental Microbiology* **7**: 98-106.
- Nauhaus K, Albrecht M, Elvert M, Boetius A & Widdel F (2007) In vitro cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environmental Microbiology* **9**: 187-196.
- Nei M & Kumar S (2000) Phylogenetic trees. *Molecular Evolution and Phylogenetics* **73**: 73-85.
- Nei M (2006) *Relative Efficiencies of Different Tree-making Methods for Molecular Data*. Oxford Univ. Press

- Nercessian O, Bienvenu N, Moreira D, Prieur D & Jeanthon C (2005) Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environmental Microbiology* **7**: 118-132.
- Newberry CJ, Webster G, Cragg BA, Parkes RJ, Weightman AJ & Fry JC (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology* **6**: 274-287.
- Niemann H (2005) Rates and signatures of methane turnover in sediments of continental margins. Thesis, University of Bremen.
- Niemann H, Elvert M, Hovland M *et al.* (2005) Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommeliten area). *Biogeosciences Discussions* **2**: 1197-1241.
- Niemann H, Duarte J, Hensen C, Omeregic E, Magalhães VH, Elvert M, Pinheiro LM, Kopf A & Boetius A (2006a) Microbial methane turnover at mud volcanoes of the Gulf of Cadiz. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**: 5336-5355.
- Niemann H, Lösekann T, De Beer D *et al.* (2006b) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854-858.
- Niemann H & Elvert M (2008) Diagnostic lipid biomarker and stable carbon isotope signatures of microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane with sulphate. *Organic Geochemistry* **39**: 1668-1677.
- Nunoura T, Oida H, Toki T, Ashi J, Takai K & Horikoshi K (2006) Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiology Ecology* **57**: 149-157.
- Nunoura T, Oida H, Miyazaki J, Miyashita A, Imachi H & Takai K (2008) Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 240-247.
- O'Brien GD (1968) Survey of diapirs and diapirism. *Diapirism and Diapirs. Memoirs of American Association of Petroleum Geologist* **8**: 1-9.
- Ogunseitan O (2007) The Concept of Microbial Species. *Microbial Diversity (First Edition)*, 3-21. Blackwell Publishing.
- Ohkuma M, Noda S, Horikoshi K & Kudo T (1995) Phylogeny of symbiotic methanogens in the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiology Letters* **134**: 45-50.
- Olu-Le Roy K, Sibuet M, Fiala-Médioni A, Gofas S, Salas C, Mariotti A, Foucher JP & Woodside J (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: Composition, symbiosis and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **51**: 1915-1936.
- Orange DL, Greene HG, Reed D, Martin JB, McHugh CM, Ryan WBF, Maher N, Stakes D & Barry J (1999) Widespread fluid expulsion on a translational continental margin: Mud volcanoes, fault zones, headless canyons, and organic-rich substrate in Monterey Bay, California. *Bulletin of the Geological Society of America* **111**: 992-1009.
- Orcutt B, Boetius A, Elvert M, Samarkin V & Joye SB (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at

- Gulf of Mexico cold seeps. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**: 4267-4281.
- Oremland RS, Marsh LM & Polcin S (1982) Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature* **296**: 143-145.
- Orphan VJ, Hinrichs KU, Ussler Iii W, Paull CK, Taylor LT, Sylva SP, Hayes JM & DeLong EF (2001a) Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing Bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1922-1934.
- Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD & DeLong EF (2001b) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**: 484-487.
- Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD & DeLong EF (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7663-7668.
- Pancost RD, Sinninghe Damsté JS, De Lint S, Van Der Maarel MJEC & Gottschal JC (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1126-1132.
- Pancost RD, Bouloubassi I, Aloisi G & Sinninghe Damsté JS (2001a) Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry* **32**: 695-707.
- Pancost RD, Hopmans EC & Sinninghe Damsté JS (2001b) Archaeal lipids in mediterranean cold seeps: Molecular proxies for anaerobic methane oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**: 1611-1627.
- Parkes RJ, Webster G, Cragg BA, Weightman AJ, Newberry CJ, Ferdelman TG, Kallmeyer J, Jørgensen BB, Aiello IW & Fry JC (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature* **436**: 390-394.
- Parkes RJ, Cragg BA, Banning N *et al.* (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environmental Microbiology* **9**: 1146-1161.
- Pérez-Belzuz F, Alonso B & Ercilla G (1997) History of mud diapirism and trigger mechanisms in the Western Alboran Sea. *Tectonophysics* **282**: 399-422.
- Perissoratis C, Papadopoulos G & Zimianitis E (1998) Occurrence of mud diapirism in the marine sector between Kos and Kalymnos islands, SE Aegean: Preliminary results. *Bulletin of Geological Society of Greece* **32**: 217-222.
- Perissoratis C (ed.) (2005) Exploration and evaluation of the eastern mediterranean gas hydrates and the associated deep biosphere (ANAXIMANDER). Final Report. Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens.
- Pernthaler A, Dekas AE, Brown CT, Goffredi SK, Embaye T & Orphan VJ (2008) Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 7052-7057.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D *et al.* (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**: 429-436.

- Phelps CD, Kerkhof LJ & Young LY (1998) Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 269-279.
- Phillips CJ, Harris D, Dollhopf SL, Gross KL, Prosser JI & Paul EA (2000) Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5410-5418.
- Pielou EC (1969) Association tests versus homogeneity tests: Their use in subdividing quadrats into groups. *Vegetatio* **18**: 4-18.
- Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, Ceccherini MT, Guerri G & Nannipieri P (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils* **45**: 219-235.
- Pimenov NV & Ivanova AE (2005) Anaerobic methane oxidation and sulfate reduction in bacterial mats on coral-like carbonate structures in the Black Sea. *Mikrobiologie* **74**: 420-429.
- Polymenakou PN, Bertilsson S, Tselepides A & Stephanou EG (2005a) Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. *Microbial ecology*. **50**: 447-462.
- Polymenakou PN, Bertilsson S, Tselepides A & Stephanou EG (2005b) Links between geographic location, environmental factors, and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* **49**: 367-378.
- Polymenakou PN, Tselepides A, Stephanou EG & Bertilsson S (2006) Carbon speciation and composition of natural microbial communities in polluted and pristine sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* **52**: 1396-1405.
- Rabus R, Hansen T & Widdel F (2002) Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. *The prokaryotes*. Springer Verlag.
- Raghoebarsing AA, Pol A, Van De Pas-Schoonen KT *et al.* (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918-921.
- Ramakrishnan B, Lueders T, Dunfield PF, Conrad R & Friedrich MW (2001) Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiology Ecology* **37**: 175-186.
- Rappe MS & Giovannoni SJ (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* **57**: 369-394.
- Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J & Amann R (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3982-3989.
- Ravenschlag K, Sahm K, Knoblauch C, Jorgensen BB & Amann R (2000) Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3592-3602.
- Reeburgh WS (1996) "Soft spots" in the global methane budget. *Microbial Growth on C1 Compounds*, Lidstrom M & Tabita F (eds.), 334-342. Kluwer Academic Publishers.
- Reed AJ, Lutz RA & Vetrani C (2006) Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich

- cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment. *Extremophiles* **10**: 199-211.
- Reed AJ, Dorn R, Van Dover CL, Lutz RA & Vetriani C (2009) Phylogenetic diversity of methanogenic, sulfate-reducing and methanotrophic prokaryotes from deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**: 1665-1674.
- Reed DL, Silver EA, Tagudin JE, Shipley TH & Vrolijk P (1990) Relations between mud volcanoes, thrust deformation, slope sedimentation, and gas hydrate, offshore north Panama. *Marine and Petroleum Geology* **7**: 44-54.
- Reed DW, Fujita Y, Delwiche ME, Blackwelder DB, Sheridan PP, Uchida T & Colwell FS (2002) Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3759-3770.
- Reeve JN, Nölling J, Morgan RM & Smith DR (1997) Methanogenesis: Genes, genomes, and who's on first? *Journal of Bacteriology* **179**: 5975-5986.
- Rheims H, Rainey FA & Stackebrandt E (1996) A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **17**: 159-169.
- Robertson A (1996) Mud volcanism on the Mediterranean Ridge: Initial results of Ocean Drilling Program Leg 160. *Geology* **24**: 239-242.
- Rosell-Melé A & McClymont EL (2007) Biomarkers as Paleoceanographic Proxies. *Proxies in Late Cenozoic Paleoceanography*, Vol. 1 Hillaire-Marcel C & De Vernal A (eds.), 441-490. Elsevier.
- Rossel PE, Lipp JS, Fredricks HF, Arnds J, Boetius A, Elvert M & Hinrichs KU (2008) Intact polar lipids of anaerobic methanotrophic archaea and associated bacteria. *Organic Geochemistry* **39**: 992-999.
- Rütters H, Sass H, Cypionka H & Rullkötter J (2001) Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Archives of Microbiology* **176**: 435-442.
- Rütters H, Sass H, Cypionka H & Rullkötter J (2002) Phospholipid analysis as a tool to study complex microbial communities in marine sediments. *Journal of Microbiological Methods* **48**: 149-160.
- Sager WW, MacDonald IR & Hou R (2003) Geophysical signatures of mud mounds at hydrocarbon seeps on the Louisiana continental slope, northern Gulf of Mexico. *Marine Geology* **198**: 97-132.
- Sahling H, Rickert D, Lee RW, Linke P & Suess E (2002) Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. *Marine Ecology Progress Series* **231**: 121-138.
- Sahm K, Knoblauch C & Amann R (1999) Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3976-3981.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Salas C & Woodside J (2002) *Lucinoma kazani* n. sp. (Mollusca: Bivalvia): Evidence of a living benthic community associated with a cold seep in the Eastern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research*

Part I: Oceanographic Research Papers
49: 991-1005.

- Sassen R, Joye S, Sweet ST, Defreitas DA, Milkov AV & MacDonald IR (1999) Thermogenic gas hydrates and hydrocarbon gases in complex chemosynthetic communities, Gulf of Mexico continental slope. *Organic Geochemistry* **30**: 485-497.
- Schouten S, Bowman JP, Rijpstra WIC & Sinninghe Damsté JS (2000) Sterols in a psychrophilic methanotroph, *Methylosphaera hansonii*. *FEMS Microbiology Letters* **186**: 193-195.
- Sekiguchi Y, Takahashi H, Kamagata Y, Ohashi A & Harada H (2001) In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: A novel isolate affiliated with a clone cluster, the Green Non-Sulfur Bacteria, Subdivision I. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5740-5749.
- Sekiguchi Y, Yamada T, Hanada S, Ohashi A, Harada H & Kamagata Y (2003) *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain bacteria at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1843-1851.
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Shima S & Thauer RK (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 643-648.
- Sibuet M & Olu-Le Roy K (2002) *Cold Seep Communities on Continental Margins: Structure and Quantitative Distribution Relative to Geological and Fluid Venting Patterns*. Springer.
- Sinninghe Damsté JS, Rijpstra WIC, Schouten S, Fuerst JA, Jetten MSM & Strous M (2004) The occurrence of hopanoids in planctomycetes: Implications for the sedimentary biomarker record. *Organic Geochemistry* **35**: 561-566.
- Sloan JED (1997) Gas hydrate tutorial. *ACS Division of Fuel Chemistry, Preprints* **42**: 449-453.
- Sloan JED (1998) Gas hydrates: Review of physical/chemical properties. *Energy and Fuels* **12**: 191-196.
- Smith JM, Castro H & Ogram A (2007) Structure and function of methanogens along a short-term restoration chronosequence in the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4135-4141.
- Smith JM, Green SJ, Kelley CA, Prufert-Bebout L & Bebout BM (2008) Shifts in methanogen community structure and function associated with long-term manipulation of sulfate and salinity in a hypersaline microbial mat. *Environmental Microbiology* **10**: 386-394.
- Sørensen KB, Finster K & Ramsing NB (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate, and methanol as possible electron shuttles. *Microbial Ecology* **42**: 1-10.
- Spiegelman D, Whissell G & Greer CW (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 355-386.
- Springer E, Sachs MS, Woese CR & Boone DR (1995) Partial gene sequences for the A

- subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 554-559.
- Sprott GD (1992) Structures of archaebacterial membrane lipids. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **24**: 555-566.
- Sprott GD, Dicaire CJ, Choquet CG, Patel GB & Ekiel I (1993) Hydroxydiether lipid structures in *Methanosarcina* spp. and *Methanococcus voltae*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 912-914.
- Stadnitskaia A, Muyzer G, Abbas B, Coolen MJL, Hopmans EC, Baas M, Van Weering TCE, Ivanov MK, Poludetkina E & Sinninghe Damsté JS (2005) Biomarker and 16S rDNA evidence for anaerobic oxidation of methane and related carbonate precipitation in deep-sea mud volcanoes of the Sorokin Trough, Black Sea. *Marine Geology* **217**: 67-96.
- Stadnitskaia A, Bouloubassi I, Elvert M, Hinrichs KU & Sinninghe Damsté JS (2008) Extended hydroxyarchaeol, a novel lipid biomarker for anaerobic methanotrophy in cold seepage habitats. *Organic Geochemistry* **39**: 1007-1014.
- Stein LY, Jones G, Alexander B, Elmund K, Wright-Jones C & Nealson KH (2002) Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* **42**: 431-440.
- Summit M, Peacock, A., Ringelberg, D., White, D.C., Baross, J.A. (2000) Phospholipid fatty acid-derived microbial biomass and community dynamics in hot, hydrothermally influenced sediments from Middle Valley, Juan De Fuca Ridge. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results* 169 1-19.
- Tachibana A (1994) A novel prenyltransferase, farnesylgeranyl diphosphate synthase, from the haloalkaliphilic archaeon, *Natronobacterium pharaonis*. *FEBS Letters* **341**: 291-294.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Tatsuoka N, Mohammed N, Mitsumori M, Hara K, Kurihara M & Itabashi H (2004) Phylogenetic analysis of methyl coenzyme-M reductase detected from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* **39**: 257-260.
- Taylor J & Parkes RJ (1983) The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General Microbiology* **129**: 3303-3309.
- Taylor J & Parkes RJ (1985) Identifying different populations of sulphate-reducing bacteria within marine sediment systems, using fatty acid biomarkers. *Journal of General Microbiology* **131**: 631-642.
- Teixidor P, Grimait JO, Pueyo JJ & Rodriguez-Valera F (1993) Isopranyl glycerol diethers in non-alkaline evaporitic environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**: 4479-4489.
- Ten Veen JH, Woodside JM, Zitter TAC, Dumont JF, Mascle J & Volkonskaia A (2004) Neotectonic evolution of the Anaximander Mountains at the junction of the Hellenic and Cyprus arcs. *Tectonophysics* **391**: 35-65.
- Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, De Vera Gomez A, Kysela D, Sylva SP, Sogin ML & Jannasch HW (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic

- methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
- Teske A & Sørensen KB (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: Have we caught them all? *ISME Journal* **2**: 3-18.
- Teske AP (2006) Microbial communities of deep marine subsurface sediments: Molecular and cultivation surveys. *Geomicrobiology Journal* **23**: 357-368.
- Thauer RK (1998) 140th Ordinary Meeting of the Society for General Microbiology, 31 March 1998: Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Thiel V, Peckmann J, Richnow HH, Luth U, Reitner J & Michaelis W (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Marine Chemistry* **73**: 97-112.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Tilman D (1982) *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press, Princeton.
- Treude T, Boetius A, Knittel K, Wallmann K & Jørgensen BB (2003) Anaerobic oxidation of methane above gas hydrates at Hydrate Ridge, NE Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* **264**: 1-14.
- Ufnar JA, Ufnar DF, Wang SY & Ellender RD (2007) Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5209-5217.
- Urakami T & Komagata K (1984) *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 188-201.
- Valentine DL & Reeburgh WS (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.
- Valentine DL, Blanton DC, Reeburgh WS & Kastner M (2001) Water column methane oxidation adjacent to an area of active hydrate dissociation, Eel River Basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**: 2633-2640.
- Valentine DL (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 316-323.
- Van Rensbergen P, Morley CK, Ang DW, Hoan TQ & Lam NT (1999) Structural evolution of shale diapirs from reactive rise to mud volcanism: 3D seismic data from the Baram delta, offshore Brunei Darussalam. *Journal of the Geological Society* **156**: 633-650.
- Vernette G, Mauffret A, Bobier C, Briceno L & Gayet J (1992) Mud diapirism, fan sedimentation and strike-slip faulting, Caribbean Colombian Margin. *Tectonophysics* **202**: 335-349.
- Vetriani C, Jannasch HW, Macgregor BJ, Stahl DA & Reysenbach AL (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4375-4384.
- Vogt PR, Gardner J & Crane K (1999) The Norwegian-Barents-Svalbard (NBS) continental margin: Introducing a

- natural laboratory of mass wasting, hydrates, and ascent of sediment, pore water, and methane. *Geo-Marine Letters* **19**: 2-21.
- Volkman JK, Johns RB, Gillan FT, Perry GJ & Bavor Jr HJ (1980) Microbial lipids of an intertidal sediment - I. Fatty acids and hydrocarbons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**: 1133-1143.
- Volkman JK (1986) A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry* **9**: 83-99.
- Von Cosel R & Salas C (2001) Vesicomidae (Mollusca: Bivalvia) of the genera *Vesicomya*, *Waisiuconcha*, *Isorropodon* and *Callogonia* in the eastern Atlantic and the Mediterranean. *Sarsia* **86**: 333-366.
- Wakeham SG, Lewis CM, Hopmans EC, Schouten S & Sinninghe Damsté JS (2003) Archaea mediate anaerobic oxidation of methane in deep euxinic waters of the Black Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**: 1359-1374.
- Wang QF, Li W, Yang H, Liu YL, Cao HH, Dornmayr-Pfaffenuemer M, Stan-Lotter H & Guo GQ (2007) *Halococcus qingdaonensis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a crude sea-salt sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 600-604.
- Webster G, Parkes RJ, Fry JC & Weightman AJ (2004) Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5708-5713.
- Webster G, John Parkes R, Cragg BA, Newberry CJ, Weightman AJ & Fry JC (2006a) Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 65-85.
- Webster G, Watt LC, Rinna J, Fry JC, Evershed RP, Parkes RJ & Weightman AJ (2006b) A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Environmental Microbiology* **8**: 1575-1589.
- Wegener G & Boetius A (2008) Short-term changes in anaerobic oxidation of methane in response to varying methane and sulfate fluxes. *Biogeosciences Discussions* **5**: 3069-3090.
- Wegener G, Shovitri M, Knittel K, Niemann H, Hovland M & Boetius A (2008) Biogeochemical processes and microbial diversity of the Gullfaks and Tommeliten methane seeps (Northern North Sea). *Biogeosciences* **5**: 1127-1144.
- Wenzhöfer F & Glud RN (2002) Benthic carbon mineralization in the Atlantic: A synthesis based on in situ data from the last decade. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **49**: 1255-1279.
- Werne JP, Baas M & Sinninghe Damsté JS (2002) Molecular isotopic tracing of carbon flow and trophic relationships in a methane-supported benthic microbial community. *Limnology and Oceanography* **47**: 1694-1701.
- Werne JP, Haese RR, Zitter T *et al.* (2004) Life at cold seeps: A synthesis of biogeochemical and ecological data from Kazan mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *Chemical Geology* **205**: 367-390.
- Werne JP & Sinninghe Damsté JS (2005) Mixed sources contribute to the molecular isotopic signature of methane-rich mud

- breccia sediments of Kazan mud volcano (eastern Mediterranean). *Organic Geochemistry* **36**: 13-27.
- White DC & Ringelberg DB (1998) Signature lipid biomarker analysis. *Techniques in Microbial Ecology* 255-272.
- Whiticar MJ (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology* **161**: 291-314.
- Wiedicke M, Neben S & Spiess V (2001) Mud volcanoes at the front of the Makran accretionary complex, Pakistan. *Marine Geology* **172**: 57-73.
- Wiedicke M, Sahling H, Delisle G, Faber E, Neben S, Beiersdorf H, Marchig V, Weiss W, Von Mirbach N & Afiat A (2002) Characteristics of an active vent in the fore-arc basin of the Sunda Arc, Indonesia. *Marine Geology* **184**: 121-141.
- Wiesenburg DA & Guinasso NLJ (1979) Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. *Journal of Chemical and Engineering Data* **24**: 356-360.
- Wilms R, Köpke B, Sass H, Chang TS, Cypionka H & Engelen B (2006a) Deep biosphere-related bacteria within the subsurface of tidal flat sediments. *Environmental Microbiology* **8**: 709-719.
- Wilms R, Sass H, Köpke B, Köster J, Cypionka H & Engelen B (2006b) Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2756-2764.
- Woese CR & Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5088-5090.
- Wolda H (1981) Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia* **50**: 296-302.
- Woodside JM, Ivanov MK & Limonov AF (1997) Neotectonics and fluid flow through the seafloor sediments in the Eastern Mediterranean and Black Seas. Part I: Eastern Mediterranean Sea. *IOC Technical Series* **48**: 1-128.
- Woodside JM, Limonov AF & Ivanov MK (1998) Neotectonics and fluid flow through seafloor sediments in the Eastern Mediterranean and Black Seas. *Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series* **48**.
- Wuebbles DJ & Hayhoe K (2002) Atmospheric methane and global change. *Earth-Science Reviews* **57**: 177-210.
- Yachi S & Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 1463-1468.
- Yamamoto S, Alcauskas JB & Crozier TE (1976) Solubility of Methane in Distilled Water and Seawater. *Journal of Chemical and Engineering Data* **21**: 78-80.
- Yano Y, Nakayama A, Ishihara K & Saito H (1998) Adaptive changes in membrane lipids of barophilic bacteria in response to changes in growth pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 479-485.
- Ye G, Wang S, Jiang L, Xiao X, Wang F, Noakes J & Zhang C (2009) Distribution and Diversity of Bacteria and Archaea in Marine Sediments Affected by Gas Hydrates at Mississippi Canyon in the Gulf of Mexico. *Geomicrobiology Journal* **26**: 370 - 381.

- Zehnder AJB & Brock TD (1980) Anaerobic methane oxidation: Occurrence and ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 194-204.
- Zeng R, Zhao J, Zhang R & Lin N (2005) Bacterial community in sediment from the Western Pacific "Warm Pool" and its relationship to environment. *Science in China, Series D: Earth Sciences* **48**: 282-290.
- Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R, Michaelis W & Widdel F (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**: 266-269.
- Zhang CL, Li Y, Wall JD *et al.* (2002) Lipid and carbon isotopic evidence of methane-oxidizing and sulfate-reducing bacteria in association with gas hydrates from the Gulf of Mexico. *Geology* **30**: 239-242.
- Zhang CL, Pancost RD, Sassen R, Qian Y & Macko SA (2003) Archaeal lipid biomarkers and isotopic evidence of anaerobic methane oxidation associated with gas hydrates in the Gulf of Mexico. *Organic Geochemistry* **34**: 827-836.
- Zhang CL, Huang Z, Cantu J, Pancost RD, Brigham RL, Lyons TW & Sassen R (2005) Lipid biomarkers and carbon isotope signatures of a microbial (Beggiatoa) mat associated with gas hydrates in the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2106-2112.
- Zhang W, Ki J-S & Qian P-Y (2008) Microbial diversity in polluted harbor sediments I: Bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **76**: 668-681.
- Zhou J, Davey ME, Figueras JB, Rivkina E, Gilichinsky D & Tiedje JM (1997) Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology* **143**: 3913-3919.
- Zitter TAC, Woodside JM & Mascle J (2003) The Anaximander Mountains: A clue to the tectonics of southwest Anatolia. *Geological Journal* **38**: 375-394.
- Zitter TAC, Huguen C & Woodside JM (2005) Geology of mud volcanoes in the eastern Mediterranean from combined sidescan sonar and submersible surveys. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **52**: 457-475.
- Zitter TAC (2006) Mud volcanism and fluid emissions in Eastern Mediterranean neotectonic zones. Thesis, VU University, Amsterdam.
- Zuckerkindl E & Pauling L (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* **8**: 357-366.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεθανιοϋδρίτες και οι υποθαλάσσιες πηγές μεθανίου έχουν προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια λόγω του οικολογικού, οικονομικού και εξελικτικού τους ενδιαφέροντος. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα, αποτελούν δυνητικές πηγές ενέργειας, ενώ παράλληλα μετέχουν στη σταθεροποίηση των ηπειρωτικών περιθωρίων. Λειτουργούν ως πηγή ενέργειας για χημειοσυνθετικού τρόπου ζωής κοινότητες, καθώς μεθάνιο και σουλφίδιο, που υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις, τροφοδοτούν μικροοργανισμούς και βενθικούς οργανισμούς που φέρουν συμβιώτες. Η Αναερόβια Οξείδωση του Μεθανίου (AOM) είναι σημαντική γεωχημική διεργασία σε αυτά τα περιβάλλοντα ωστόσο δεν έχει διερευνηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Πιστεύεται ότι διενεργείται σε σύζευξη με τη θεική αναγωγή, μέσω μίας μικροοργανισμικής συντροφίας μεθανιότροφων Αρχαίων (ANME) με θεικοαναγωγικά Βακτήρια.

Η AOM λειτουργεί ως ένα ιδιαιτέρως αποδοτικό φίλτρο, καθώς δεσμεύει περισσότερο από το 80% του μεθανίου που παράγεται στα υποθαλάσσια ιζήματα. Το μεθάνιο αυτό, αν απελευθερωνόταν στην ατμόσφαιρα, θα ενίσχυε σημαντικά το φαινόμενο του θερμοκηπίου και τις σχετιζόμενες με αυτό πλανητικές αλλαγές. Άλλη οδός κατανάλωσης του μεθανίου είναι η αερόβια οξείδωση του μεθανίου (MOx) που λαμβάνει χώρα σε οξυγώμενα στρώματα ιζήματος ή νερού. Ενώ μεθάνιο μπορεί να παραχθεί μέσω της μικροοργανισμικής Μεθανιογένεσης. Μεθανιοϋδρίτες και ψυχρές αναβλύσεις έχουν βρεθεί στα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος του Αναξίμανδρου στην Ανατολική Μεσόγειο.

Η δομή των προκαρυωτικών κοινοτήτων στα θαλάσσια ιζήματα καθορίζεται από τις μεταβολές των φυσικοχημικών και γεωχημικών παραγόντων κατά μήκος του ιζήματος. Οι μεταβολές στις βιοκοινότητες κατά μήκος δύο πυρήνων ιζήματος, μία από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam και μία από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο ιλύος Kazan εξετάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής με στόχο τη διερεύνηση, σε υψηλή κατακόρυφη ανάλυση, της βιοποικιλότητας και οικοφυσιολογίας των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στο σχηματισμό (μεθανιογένεση) και δέσμευση (οξείδωση) του μεθανίου. Τα επιμέρους ερωτήματα που τέθηκαν είχαν σκοπό (α) τη διερεύνηση της ύπαρξης ενεργών μικροοργανισμικών κοινοτήτων που εμπλέκονται στην AOM και στις σχετιζόμενες με αυτή διεργασίες (β) την καταγραφή των σημαντικότερων «πρωταγωνιστών» (key players) και εξέταση του κατά πόσο ένας, λίγοι ή πολλοί φυλότυποι με διαφορετικές σχετικές αφθονίες μετέχουν στις προκαρυωτικές συναθροίσεις (γ) την αποκάλυψη προτύπων ποικιλότητας και ομοιότητας μεταξύ των κοινοτήτων και (δ) τη διερεύνηση της λειτουργικής ποικιλότητας των μικροοργανισμών που σχετίζονται με το μεταβολισμό του μεθανίου.

Δείγματα ιζήματος συλλέχθηκαν, κάθε 5 cm. από την επιφάνεια ως τα 30 cm, πυρήνων ιζήματος και ταυτοποιήθηκαν χαρακτηριστικοί βιοδείκτες των Αρχαίων που εμπλέκονται στην AOM καθώς και των Βακτηρίων που δρουν σε συντροφία με τα Αρχαία ανάγοντας θειικά. Ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις *sn*-2,3-δι-*O*-ισοπρενοειδών γλυκερολαιθέρων (κυρίως αρχαιόλης και *sn*-2-υδροξυαρχαιόλης). Οι τιμές που μετρήθηκαν ήταν πολύ υψηλότερες (3 ως

12 φορές) για τα ιζήματα του Amsterdam σε σχέση με το Kazan. Στο υποθαλάσσιο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, το μέγιστο στην αφθονία των βιοδεικτών για τα Αρχαία παρατηρήθηκε στον ορίζοντα των 15 – 20 cmbsf (cm below sea floor, cm κάτω από την επιφάνεια του πυθμένα) και ο ορίζοντας αυτός συμπίπτει με τη ζώνη μετάβασης μεθανίου – θειικών. Στον πυρήνα από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Kazan δύο τοπικά μέγιστα παρατηρήθηκαν στους ορίζοντες 5-10 και 20-25 cmbsf, που αντιστοιχούν στην πρωταρχική ζώνη μετάβασης μεθανίου – θειικών στον ορίζοντα 7 με 13 cmbsf και σε μία δευτερεύουσα ζώνη μετάβασης στα 20 με 25 cmbsf.

Χαρακτηριστικά λιπαρά οξέα, όπως τα C16:1ω7c και C18:1ω7c, έδειξαν κυριαρχία των θειοοξειδωτικών Βακτηρίων (SOx) στο επιφανειακό μισό των πυρήνων και για τα δύο ηφαίστεια. Ενδεικτικά λιπαρά οξέα για Βακτήρια που ανάγουν θειικά σε σύζευξη με την AOM, όπως τα C16:1ω5c, cyC17:0ω5,6, aiC15 και iC15 ανιχνεύθηκαν επίσης σε σημαντικές ποσότητες.

Η κατακόρυφη κατανομή των κοινοτήτων Αρχαίων και Βακτηρίων μελετήθηκε λεπτομερέστερα με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του 16S rRNA γονιδίου. Η πλειονότητα των φυλοτύπων των Αρχαίων που βρέθηκαν και στα δύο ηφαίστεια ιλύος ανήκουν στα Euryarchaeota. Στο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, φυλότυποι που ανήκουν στα ANME-1 φαίνεται να συνεπικρατούν με φυλοτύπους των ANME-2 σε όλες τις βιβλιοθήκες κλώνων που κατασκευάστηκαν, εκτός από τον ορίζοντα των 30 cmbsf, όπου κυριαρχούν τα ANME-3. Στις βιβλιοθήκες των Βακτηρίων επικράτησαν τα Proteobacteria (κυρίως τα υπόφυλα των γ-, δ- and ε-Proteobacteria) στους ορίζοντες ιζήματος 0 και 5 cmbsf. Φυλότυποι σχετιζόμενοι με το φύλο

των Chloroflexi βρέθηκαν σε όλους τους ορίζοντες ιζήματος και επικράτησαν στα 10 cmbsf. Φυλότυποι που σχετίζονται με το υποψήφιο φύλο των JS1 ήταν επίσης παρόντες σε όλους τους ορίζοντες ιζήματος και κυριάρχησαν στα 15 cmbsf. Τα δ-Proteobacteria είχαν σημαντική αντιπροσώπευση σε όλες τις βιβλιοθήκες κλώνων και επέδειξαν τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία στα 25 cmbsf. Γενικά, οι περισσότεροι από τους φυλοτύπους που ανιχνεύθηκαν σχετίστηκαν με φυλοτύπους από περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο, όπως ψυχρές αναβλύσεις και ιζήματα μεθανιούδριτών. Ανήκουν κυρίως σε πιθανούς θεικοαναγωγικούς και θειοοξειδωτικούς οργανισμούς.

Στο ηφαίστειο ιλύος Kazan η πλειονότητα των φυλοτύπων των Αρχαίων σχετίζονται με μη καλλιεργήσιμα μέλη των ANME-2 από περιβάλλοντα όπου διενεργείται AOM. Ανιχνεύθηκαν επίσης ομάδες των ANME-1 και ANME-3. Όσον αφορά τις βιβλιοθήκες κλώνων των Βακτηρίων, τα Proteobacteria ήταν το πιο άφθονο και ποικίλο φύλο, με τα γ-Proteobacteria να κυριαρχούν στον επιφανειακό ορίζοντα. Τα δ-Proteobacteria περιλάμβαναν πολλούς από τους γνωστούς θεικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς που λειτουργούν ως σύντροφοι των ANME. Οι υπόλοιποι από τους φυλότυπους των Βακτηρίων ανήκουν σε 15 φύλα, με καλλιεργημένους ή όχι αντιπροσώπους και τρεις ομάδες μη σχετιζόμενες με γνωστά φύλα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι φυλότυποι που βρέθηκαν αντιπροσωπεύουν μικροοργανισμούς από αντίστοιχα περιβάλλοντα.

Η ποικιλότητα υπολογίστηκε με τη χρήση του δείκτη ποικιλότητας Shannon-Wiener (H) και το δείκτη ισοκατανομής Pielou (J). Ο δείκτης Shannon στον ίδιο ορίζοντα

ιζήματος ήταν μικρότερος για τις βιοκοινότητες των Αρχαίων σε σχέση με αυτές των Βακτηρίων, αλλά δεν παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο μεταβολής με το βάθος για τις δύο επικράτειες. Για τις βιοκοινότητες των Αρχαίων ο Η κυμάνθηκε από 0,99 ως 1,72 για το Amsterdam και 0,56 ως 1,73 για το Kazan. Στις βιοκοινότητες των Βακτηρίων ο Η υπολογίστηκε μεταξύ 1,92 – 4,03 και 1,47 – 3,82 για το Amsterdam και Kazan, αντίστοιχα. Ο δείκτης ισοκατανομής J ακολούθησε το ίδιο πρότυπο μεταβολής με τον Η στους περισσότερους ορίζοντες.

Η ανάλυση ομαδοποίησης, χρησιμοποιώντας το δείκτη Morisita για την κατασκευή μήτρας ομοιότητας, έδειξε ότι υπάρχουν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ των βιοκοινοτήτων του ίδιου ηφαιστείου λύος. Ο βαθμός ομοιότητας των κοινοτήτων των Βακτηρίων, με εξαίρεση τους ορίζοντες 15 και 20 cmbfsf και για τα δύο ηφαιστεία λύος, ήταν χαμηλός στο επίπεδο του φυλοτύπου, υποδεικνύοντας μικρή επικάλυψη μεταξύ των Βακτηριακών κοινοτήτων των διαφορετικών οριζόντων.

Η παρουσία και η λειτουργική ποικιλότητα των Αρχαίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του μεθανίου (μεθανιότροφα και μεθανιογόνα Αρχαία) αναλύθηκε μέσω της ανίχνευσης και φυλογενετικής ανάλυσης του γονιδίου *mcrA*. Το γονίδιο *mcrA* κωδικοποιεί την υπομονάδα α της αναγωγής του μεθυλοσενενζύμου Α, ενζύμου κλειδί τόσο για τη μεθανιογένεση όσο και για την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου.

Το γονίδιο *mcrA* ανιχνεύθηκε σε όλους τους ορίζοντες ιζήματος της θέσης του ηφαιστείου λύος Amsterdam και σε όλους, εκτός του επιφανειακού ορίζοντα ιζήματος, του Kazan. Πιθανοί παραγωγοί μεθανίου που σχετίζονται φυλογενετικά με το

Methanogenium organophilum ανιχνεύθηκαν μόνο στο βαθύτερο ορίζοντα (30 cmbfsf) και για τα δύο ηφαιστεία λύος. Οι υπόλοιποι φυλότυποι που βρέθηκαν ανήκουν στις φυλογενετικές ομάδες *mcr a,b*, *mcr c*, *mcr e* and *mcr f*. Γενικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης του γονιδίου *mcrA* είναι σε συμφωνία με τη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου για το ηφαιστείο λύος Kazan. Στην περίπτωση του Amsterdam φαίνεται να υπάρχει αδυναμία στην ανίχνευση της ομάδας *mcr a,b* (που αντιστοιχεί στα ANME-1) για τους ορίζοντες ιζήματος 15 and 20 cmbfsf.

Η AOM είναι σημαντική βιογεωχημική διεργασία στην πλειονότητα πλούσιων σε μεθάνιο ιζημάτων, όπως οι ψυχρές αναβλύσεις, όπως φαίνεται σε όλα τα δεδομένα από τα περιβάλλοντα αυτά, από την κατανομή των γεωχημικών και ιζηματολογικών στοιχείων μέχρι την παρουσία των επίταγων ανθρακικού άλατος και των πλούσιων (χημειοσυνθετικών) βενθικών βιοκοινοτήτων. Στις θέσεις ιζήματος που μελετήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας των ηφαιστείων λύος Amsterdam και Kazan όλες οι ενδείξεις, όπως οι κατανομές μεθανίου – θεικών, οι υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδιακών βιοδεικτών, οι φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν, υποδεικνύουν ότι η AOM είναι πιθανά ενεργή διεργασία σε αυτά τα ιζήματα.

Διαφορές στο μέγεθος, τη συγκέντρωση και τη ροή του μεθανίου, τα ιζηματολογικά και γεωχημικά χαρακτηριστικά καθώς και το ιστορικό εκρήξεων μεταξύ των δύο ηφαιστείων λύος Amsterdam και Kazan (δύο ηφαιστείων που βρίσκονται στο ίδιο πεδίο ηφαιστείων και έχουν μικρή γεωγραφική απόσταση μεταξύ τους) είναι πιθανοί παράγοντες που έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των προκαρυωτικών κοινοτήτων σε αυτά. Επίσης, από την κατανομή των προτύπων βιοποικιλότητας και την ανάλυση

ομαδοποίησης φαίνεται ότι για κάθε ένα από τα ηφαίστεια ιλύος η ηφαιστειακότητα (ιλύος) οδηγεί στη διαμόρφωση διαφορετικών βιοκοινοτήτων για κάθε επικράτεια.

Το αποτύπωμα των λιπιδιακών βιοδεικτών και οι φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν έδειξαν, ωστόσο, ότι και για τα δύο ηφαίστεια

παρόμοιες ομάδες μικροοργανισμών κυριάρχησαν. Τα Αρχαία που βρέθηκαν, στην πλειονότητά του σχετίστηκαν με τις ομάδες των ANME και τα Βακτήρια με πιθανούς θεικοαναγωγικούς, θειοοξειδωτικούς αλλά και ετερότροφους μικροοργανισμούς.

ABSTRACT

Cold seeps and gas hydrates sediments have an intrinsic role in the carbon cycle and therefore have become environments of intensive study in recent years. They function as energy source for chemosynthetically based life, can be used as potential energy resource and play an important role in slope stabilization. Sulfide and methane are available in high concentrations and support a variety of highly adapted microorganisms and symbiont-bearing invertebrates. The anaerobic oxidation of methane (AOM) is a key biogeochemical process at cold seeps and is assumed to be coupled to sulfate reduction and mediated by a consortium of anaerobic methanotrophic Archaea (ANME) and sulfate-reducing Bacteria (SRB). AOM acts as a scavenger to significant amounts of methane which could otherwise be released in the atmosphere, contributing, to climate change. Another sink for methane in the ocean is the aerobic oxidation of methane (MOx) whilst methane can be produced by microbially mediated Methanogenesis. Active methane seeps and gas hydrates have been identified on a number of mud volcanoes (MV) in the Anaximander Mountains, East Mediterranean Sea.

The structure of highly complex prokaryotic communities harboured in marine sediments is dictated by rapid changes of physical and geochemical factors along sediment depth in hot-spot sites, like MVs. In this thesis, sediment from two mud volcanoes, Amsterdam and Kazan were analysed and it was investigated whether (a) the community structure of Bacteria and Archaea vary concomitantly, (b) the prokaryotic assemblages are dominated by one or several phylotypes with different relative abundances, implying a

specific or an opportunistic community, respectively, and also (c) which of these specific communities are involved in biogeochemical processes related to mud volcanism.

Sediment samples were sampled every 5 cm of the top 30 cm sediment and the distribution of specific biomarkers derived from ANME groups and SRB were investigated. High abundances of *sn*-2,3-di-*O*-isoprenoidal glycerol ethers (mainly archaeol and *sn*-2-hydroxyarchaeol) were retrieved. The concentrations measured were much higher (3 to 12 times) in Amsterdam sediments related to Kazan. In Amsterdam MV, maximum in archaeal biomarker abundances at 15-20 cmbsf (cm below sea floor) horizon correlated with the methane-sulfate transition zone and the measured concentrations are the highest reported so far for mud volcano's sediments. In Kazan MV two local maxima were present at horizons 5-10 and 20-25, whereas the primer transition zone seemed to be placed from 7 to 13 cmbsf and a minor one at 20 to 25 cmbsf. Specific bacterial markers such as C16:1 ω 7c, C18:1 ω 7c showed dominance of sulphide oxidizing Bacteria (SOx) in the upper layers for both volcanoes. Characteristic fatty acids C16:1 ω 5c, cyC17:0 ω 5,6 for AOM related SRB were also present in high concentrations.

The vertical distribution of the archaeal and bacterial community composition was studied further with the construction of 16S RNA gene libraries from the same sites of Amsterdam and Kazan MVs. The vast majority of all archaeal phylotypes retrieved in both mud volcanoes belong to Euryarchaeota. In Amsterdam MV, ANME-1 and ANME-2 seem to co-dominate all archaeal libraries constructed except the one from 30 cmbsf horizon, where

ANME-3 was the dominant group. In bacterial clone libraries Proteobacteria (mainly γ -, δ - and ϵ - groups) dominated 0 and 5 cmbsf. Choloflexi-affiliated phylotypes were present in all sediment layers and dominated 10 cmbsf horizon. Phylotypes belonging to candidate division JS1 were also present in all sediment horizons but exhibited their highest relative abundance at 15 cmbsf. Phylotypes affiliated with δ -Proteobacteria had significant representation in all bacterial libraries and showed substantial percentage at 25 cmbsf. The vast majority of all bacterial phylotypes retrieved was closely related with methane seeps and gas hydrate environments. They were affiliated with putative sulfate-reducers, sulfide oxidizers, sulfur reducers and methylotrophs

In Kazan MV, the majority of the archaeal phylotypes were related to uncultivated members of ANME-2, from habitats where AOM occurs. ANME-1 and ANME-3 groups were also present. In bacterial clone libraries from Kazan MV, Proteobacteria were the most abundant and diverse bacterial group, with the γ -Proteobacteria dominating in most sediment layers and were related to members from marine sediments involved in methane cycling. The δ -Proteobacteria included several of the sulfate-reducers known to co-occur with anaerobic methane oxidizers. The rest of the bacterial phylotypes were shared among 15 known phyla, with cultured and uncultured representatives, and three unaffiliated groups. In most cases, these phylotypes represented microorganisms from similar, marine and non-marine, habitats.

Diversity was calculated by Shannon-Wiener diversity index (H) and Pielou evenness index (J). The Shannon diversity index for Archaea was lower than for Bacteria in the same sediment horizon but indices did not co-vary for

the two groups with sediment depth. For the archaeal communities H was calculated in Amsterdam MV between 0.99 – 1.72 and in Kazan MV 0.56 – 1.73. For the bacterial communities, H varied between 1.92 – 4.03 and 1.47 – 3.82 for Amsterdam and Kazan MV, respectively. Pielou index showed similar distribution pattern with H in most horizons.

Cluster analysis using Morita similarity index revealed that more similarities are shared within different layers from the same MV rather than between the two volcanoes. The level of similarity of bacterial communities, with the exception of the communities at 15 and 20 cmbsf for both volcanoes, was low when phylotypes were used, indicating little overlap across the rest sediment layers. So apart from the clustered 15/20 horizons, each of the other horizons appeared to be a different habitat containing its own unique community of bacteria.

The presence and the functional diversity of Archaea involved in methane metabolism (methanotrophs and methanogens) were investigated by detection and phylogenetic analysis of *mcrA* gene. This gene encodes for methyl-coenzyme M reductase, an essential enzyme in both anaerobic methane oxidation and methane production. The *mcrA* gene was present in all sediment horizons at Amsterdam MV and in all, but the surface horizon at Kazan MV. Putative methane producers related to *Methanogenium organophilum* were detected only in the deepest analyzed sediment layer for both MVs. The rest of the phylotypes were affiliated with functional group mcr a,b, mcr c, mcr e and mcr f. Generally, the results of *mcrA* analysis are in agreement with the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene for Kazan MV. In the case of Amsterdam MV there seems to be a failure in

detecting *mcr a,b* group (corresponding to ANME-1) at 15 and 20 cmbsf.

AOM is a significant biogeochemical process in many cold-seep sediments, evident in everything from pore water and sedimentary geochemical profiles to authigenic carbonates to (chemosynthetic) macrofaunal abundance and diversity. In sediments from both Amsterdam and Kazan mud volcano, measured pore water profiles of the concentrations of sulfate, sulfide, detected high values of archaeol and hydroxyarchaeol and bacterial biomarkers, retrieved phylotypes in both 16s rRNA gene and *mcrA* gene libraries, all indicate that AOM is presently occurring in the sediments of these two mud volcano.

Differences in the size, methane concentrations and fluxes, sedimentological and

geochemical characteristics and eruptive history between Amsterdam and Kazan MV (two geographically close mud volcanoes) have probably led to the formation of different prokaryotic communities in each of them. Moreover, for each mud volcano, it seems that mud volcanism shapes mixed prokaryotic communities at the domain level, with Archaea following different diversity patterns with sediment depth than Bacteria. Archaeal ribosomal RNA gene sequences are consistent with dominance of AOM-like organisms, while the majority of recovered bacterial sequences affiliate with sulfate-reducers, sulfide oxidizers, sulfur reducers and methylotrophs.

